



# A novel gas chromatography mass spectrometry-based serum screening method for oral squamous cell carcinoma

Kimoto, Akira

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2013-09-25

(Date of Publication)

2014-09-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第5951号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005951>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

### A novel gas chromatography mass spectrometry-based serum screening method for oral squamous cell carcinoma

口腔扁平上皮癌に対するガスクロマトグラフ質量分析計を用いた新規血清スクリーニング手法

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
口腔外科学  
(指導教員：古森孝英教授)

木本 明

口腔扁平上皮癌に対するガスクロマトグラフ質量分析計を用いた新規血清スクリーニング手法

#### 緒論

口腔扁平上皮がん (OSCC) は世界で 11 番目に多いがんとされ、2008 年には世界で 263,000 人が罹患しており、127,000 人が死亡している。OSCC と診断された患者の 5 年生存率は、早期がんで 80-90%、進行がんで 30%以下とされており、進行がん患者の治療は顔貌や食事、会話などに大きな影響を与え、QOL の低下をもたらす。このことより、早期診断、早期治療が重要になってくる。現在の主ながん発見方法は視診と触診で、腫瘍マーカーである SCC 抗原は感度の点から、また、画像診断はコストの点からスクリーニング手法としては適していない。また、組織診断は侵襲的であり、スクリーニングとしては、やはり、適していない。そこで本研究では、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を用いた血清メタボローム解析によって、血清から新たなバイオマーカーの発見を試みた。

メタボローム解析は、アミノ酸や有機酸、脂肪酸などの低分子代謝産物を網羅的に分析する方法で、近年、注目を浴びてきている。代謝産物は、生理機能や病態を直接的に表現していることが多く、その分析は、遺伝子と表現型との関係を明らかにする上で重要になると考えられる。メタボローム解析の方法としては、核磁気共鳴装置や液体クロマトグラフ質量分析計を使用するものなどが存在するが、今回の研究では GC/MS を用いている。GC/MS は、その使用方法が比較的簡便で、血清代謝物分析の膨大なデータベースがあること、再現性が高いことなどの利点があり、これまでに本研究室において、他臓器がんの血清メタボローム解析にも使用してきている実績がある。

#### 実験方法

##### 対象者

本研究は、神戸大学医学部附属病院の倫理委員会にて承諾を得て、対象者の同意の元に行われた。トレーニングセットとして、OSCC 手術前と、手術後 2 週間以上経過した際の患者と、健康診断にて異常がないことが確認された健常者を 18 人ずつ設定した。また、バリデーションセットとして OSCC 手術前の患者と、健常者を 17 人ずつ設定した。これらとは別に、OSCC 以外の口腔疾患の手術前と手術後の患者をそれぞれ 12 人、10 人設定した。なお、OSCC の確定診断は病理組織検査にて行っている。各対象者から採取した血清サンプルは測定まで -80℃にて保存した。前処理として、50  $\mu$ l の血清を用意したのち、2-isopropylmalic acid を内部標準物質として添加し、メタノール、クロロホルム、水で抽出した。その後、水溶性成分を凍結乾燥し、ピリジンで溶解、オキシム化、TMS 誘導体化し GC/MS2010Ultra で測定した。

##### 統計分析

GC/MSにて各代謝産物の半定量解析を行った。その後、トレーニングセットにて OSCC

患者の術前と健常者の結果を Wilcoxon の順位和検定により比較した。また、OSCC 患者の術前、術後の結果を Wilcoxon の符号付順位検定により比較した。これらにより、OSCC において有意に変動しているバイオマーカー候補の代謝産物を導き出し、バリデーションセットでの確認を行った。また、口腔疾患にて手術したこと自体の影響を考慮するため、がん以外の口腔疾患患者の術前と健常者の結果を Wilcoxon の順位和検定により、また、がん以外の口腔疾患患者の術前、術後の結果を Wilcoxon の符号付順位検定により比較した。バイオマーカー候補分子に対して、トレーニングセットの結果を元に多変量解析を行い、受信者動作特性曲線 (ROC 曲線) を描き、感度、特異度、カットオフ値を決定した。また、この結果より 2 変量に基づいた予測式を重回帰分析を用いて作成し、バリデーションセット、トレーニングセット+バリデーションセットの値からその予測式の評価を行った。

## 結果

本研究では、101 種類の代謝産物が血清中で同定でき、そのうち 1 種類は内部標準物質として加えた 2-isopropylmalic acid であった。トレーニングセットにて OSCC 患者の術前と健常者を Wilcoxon の順位和検定により比較した結果、38 種類の代謝産物に有意な変動を認めた ( $p < 0.05$ )。また、OSCC 患者の術前と術後を Wilcoxon の符号付順位検定にて比較した結果、32 種類の代謝産物に有意な変動を認めた。そのうち 13 種類の代謝産物が、術前と健常者との比較、そして、術前術後での比較にて共通の変動を示した。13 種類の代謝産物に対して、バリデーションセットでの確認を行った結果、7 種類の代謝産物: glyceric acid, serine (3TMS), lauric acid, N-acetyl-L-aspartic acid\_1, asparagine, ornithine, heptadecanoate がバイオマーカー候補分子として選ばれた。がん以外の口腔疾患患者と健常者との比較では、7 種類のバイオマーカー候補分子のうち ornithine を除く 6 種類で有意な変動を認めたが、口腔疾患の術前と術後ではどのバイオマーカー候補物質も有意差を認めなかった。がんステージ別の比較では、ステージが進む程、7 種類全てのバイオマーカー候補物質で高い値を示した。これらの結果を元に、さらなる高感度、高特異度を目指し、7 種類の代謝産物のうちの 2 種類を用いた予測式を多変量解析より導き出した。これにより、ornithine+asparagine, ornithine+glyceric acid, ornithine+N-acetyl-L-aspartic acid, ornithine+serine (3TMS) の 4 種類の組み合わせによる予測式を構築でき、それらを用いることで、80%以上の感度と 70%以上の特異度を得ることができた。

## 考察

早期診断された OSCC の 5 年生存率が 80-90%であるのに対して、進行がんは 30%以下に低下する。現状で使用されている代表的な OSCC 腫瘍マーカーである SCC 抗原は、早期 OSCC に対する感度は 30%以下とされており、早期診断には適していないのが現状である。今回の研究で、新たな血清メタボローム解析法により、

OSCC の早期診断に利用できる glyceric acid, lauric acid, N-acetyl-L-aspartic acid, ornithine, heptadecanoate, serine, asparagine のバイオマーカー候補分子が判明した。これらのバイオマーカー候補分子の OSCC 早期がんに対する感度は、glyceric acid (77.7%), lauric acid (83.3%), N-acetyl-L-aspartic acid (66.6%), ornithine (88.8%), heptadecanoate (66.6%), serine (38.8%), asparagine (50.0%) であり、特異度は glyceric acid (88.5%), lauric acid (100%), N-acetyl-L-aspartic acid (97.1%), ornithine (85.7%), heptadecanoate (80.0%), serine (97.1%), asparagine (91.4%)であった。さらに、ornithine+asparagine, ornithine+glyceric acid, ornithine+N-acetyl-L-aspartic acid, ornithine+serine (3TMS) の 2 変量で構成された予測式の感度と特異度はそれぞれ、94.4%と 82.8%、88.8%と 85.7%、88.8%と 97.1%、88.8%と 82.8%であったことから、これらのバイオマーカー候補分子が、OSCC の早期診断に有用であることが示唆された。

現在までに OSCC スクリーニング法に関する様々な研究がなされており、核磁気共鳴装置を用いた血漿メタボローム解析では、本研究と同様な結果を示して、ornithine と asparagine の値が OSCC 患者では増加していた。OSCC 患者は一般的に、嚥下障害や栄養不足のために必須アミノ酸や非必須アミノ酸が不足していると考えられている。しかし、先程の報告では対象患者全ての栄養状態に問題がなかったことから、ornithine と asparagine は栄養状態に左右されない可能性が考えられる。また、OSCC 早期診断方法を確立するために、今後は、喫煙や飲酒、ヒトパピローマウイルスなどの OSCC リスク因子の影響も調べていく必要があると考えられる。

## 結論

本研究による成果は、血清メタボローム解析による新たな OSCC スクリーニング手法の第一歩となる可能性を秘めている。本研究により明らかにできた新たなバイオマーカー候補分子の高い感度は、従来の腫瘍マーカーより効果的であり、術前術後の比較検討結果から、再発の有無の評価にも対応しうると考えられる。今後は他臓器がんとの比較や、多施設研究を進めていく必要があると思われる。

学位論文の内容要旨

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2368号	氏 名	木本 明
論文題目 Title of Dissertation	A novel gas chromatography mass spectrometry-based serum screening method for oral squamous cell carcinoma 口腔扁平上皮癌に対するガスクロマトグラフ質量分析を用いた新規血清スクリーニング手法		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner	丹生 健一	
	副 査 Vice-examiner	錦織 裕子	
	副 査 Vice-examiner	寺 師 浩 人	

A novel gas chromatography mass spectrometry-based serum screening method for oral squamous cell carcinoma

口腔扁平上皮癌に対するガスクロマトグラフ質量分析計を用いた新規血清スクリーニング手法

口腔扁平上皮がん (OSCC) の5年生存率は、早期がんで80-90%、進行がんで30%以下とされており、進行がん患者の治療は顔貌や食事、会話などに大きな影響を与え、QOLの低下をもたらす。このことより、早期診断、早期治療が重要になってくる。現在の主ながん発見方法は視診と触診で、腫瘍マーカーであるSCC抗原は感度の点から、また、画像診断はコストの点からスクリーニング手法としては適していない。また、組織診断は侵襲的であり、スクリーニングとしては、やはり、適していない。そこで本研究では、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を用いた血清メタボローム解析によって、血清から新たなバイオマーカー発見の試みがされた。

対象者は、OSCC手術前と、手術後2週間以上経過した際の患者と、健康診断にて異常がないことが確認された健常者を18人ずつ用意し、トレーニングセットとした。また、バリデーションセットとしてOSCC手術前の患者と、健常者を17人ずつ設定した。これらとは別に、OSCC以外の口腔疾患の手術前と手術後の患者をそれぞれ12人、10人設定した。

GC/MSにて各代謝産物の半定量解析を行った結果、101種類の代謝産物が血清中で同定可能であった。トレーニングセットにてOSCC患者の術前と健常者をWilcoxonの順位検定により比較した結果、38種類の代謝産物に有意な変動を認めた ( $p < 0.05$ )。また、OSCC患者の術前と術後をWilcoxonの符号付順位検定にて比較した結果、32種類の代謝産物に有意な変動を認めた。そのうち13種類の代謝産物が、術前と健常者との比較、そして、術前術後での比較にて共通の変動を示した。13種類の代謝産物に対して、バリデーションセットでの確認を行った結果、7種類の代謝産物: glyceric acid, serine (3TMS), lauric acid, N-acetyl-L-aspartic acid\_1, asparagine, ornithine, heptadecanoate がバイオマーカー候補分子として選ばれた。がん以外の口腔疾患患者と健常者との比較では、7種類のバイオマーカー候補分子のうちornithineを除く6種類で有意な変動を認められたが、口腔疾患の術前と術後ではどのバイオマーカー候補物質も有意差を認めなかった。

がんステージ別の比較では、ステージが進む程、7種類全てのバイオマーカー候補物質で高い値を示した。これらの結果を基に、さらなる高感度、高特異度を目指し、7種類の代謝産物のうちの2種類を用いた予測式を多変量解析より導き出した。これにより、ornithine+asparagine、ornithine+glyceric acid、ornithine+N-acetyl-L-aspartic acid、ornithine+serine (3TMS)の4種類の組み合わせによる予測式を構築でき、それらを用いることで、80%以上の感度と70%以上の特異度を得ることができた。以上の結果より、これらのバイオマーカー候補分子が、OSCCの早期診断に有用であることが示唆された。

以上、本研究は、GC/MSを用いた血清メタボローム解析により、新規口腔がんスクリーニング手法の可能性を示したものであるが、従来の口腔がん腫瘍マーカーと異なった手法を用い、高い感度・特異度を示すなど、口腔がんスクリーニングに関して、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。