

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

橋本健吾

論文題目

口腔扁平上皮癌に関連する口腔細菌叢解析の有用性

I. 緒言

口腔扁平上皮癌 (OSCC) の大部分は肉眼的に発見可能であるが進行癌として診断されることも少なくありません。そのため、診断の遅れが予後不良の一因となっており、早期発見のための信頼性の高い簡便な診断マーカーの開発が進められていますが、これまでに口腔細菌叢の臨床応用の可能性についてはほとんど検討されていません。今回、採取が比較的簡便で臨床応用しやすい唾液検体の細菌叢を解析し、口腔細菌叢解析の OSCC 診断における有用性についての検討が行われました。

II. 対象および方法

1. 対象

愛知学院大学歯学部附属病院口腔外科第二診療部と名古屋第一赤十字病院歯科口腔外科を受診したOSCC患者41例 (OSCC群)、口腔白板症患者25例 (OLK群)、OSCC術後患者20例 (Post群)、健常者10例 (HV群) を対象として唾液検体を採取した。

2. DNA抽出および DNAライブラリ作成

1) 唾液検体からの DNAの抽出

唾液検体から推奨されるプロトコールにてtotal DNAを抽出した。

2) DNAライブラリ作成

抽出したDNAから2-step tailed ポリメラーゼ連鎖反応法によってライブラリを作成した。増幅させる領域は細菌の16S rRNA V4領域とした。

3. シークエンス解析

1) リードのクオリティーフィルタリング

シークエンシングはMiSeq pyrosequencing platform (Illumina) を用いて施行し、FASTX toolkit を用いて配列の読み始めが使用プライマーと完全一致する配列のみを抽出した。抽出した配列のプライマー配列を除去したのち、sickle tools にてクオリティー値が 20 未満の配列を取り除き、40 塩基以下の長さとなった配列とそのペア配列を破棄した。

2) リードのマージ

ペアエンドマージスクリプトFLASHを用いて、クオリティーフィルタリングを通過した配列をマージした。

3) キメラチェック、operational taxonomic units (OTU)作成と系統推定

フィルタリングを通過した配列を、USEARCHのUchimeアルゴリズムでキメラ配列をチェックした。データベースはQIIME (Quantitative Insights into Microbial Ecology) に付属するGreengeneの97%OTUとし、キメラと判断さ

れなかった全配列を抽出した。OTU作成と系統推定は、Human Oral Microbiome Databaseの配列をリファレンスとして行った。

4) OTU頻度の4群間比較

OTU頻度の群間比較は、QIIMEを用いて行った。解析対象は細菌の分類階級では属レベルまでとした。

4. 多様性解析とLEfSe解析

1) 多様性解析

4群 (OSCC群、OLK群、Post群、HV群) において、各群の細菌叢の多様性を解析し比較検討するため、アルファ多様性とベータ多様性の解析をQIIMEによって行った。

2) LEfSe (Linear discriminant analysis of effective size) 解析

各群で有意に増加している細菌を検出するためにLEfSeによる解析を行った。LEfSe解析はGalaxy / Hutlabアルゴリズムを用いて行った。OSCC群とOSCCなし (OLK+Post) 群、OLK群、Post群との比較によってOSCC関連候補細菌を抽出した。HV群は他の群と年齢層が異なるため解析から除外した。また、OSCC群の中で初期癌 (early群) と進行癌 (late群) との間や、術後

1年以内に早期再発を生じた症例 (rec群) と非再発症例 (non-rec群) との間でもLEfSe解析を行った。

5. 口腔扁平上皮癌診断・予後因子としての検討

1) 候補細菌の診断カットオフ値の決定

各細菌が占める分布割合によってOSCC群とOSCCなし群を区別できる最適なカットオフ値をROC曲線の結果から決定した。

2) 診断・予後因子としての検討

各OSCC関連候補細菌割合の診断カットオフ値が適切であるかどうかについて単変量解析、年齢、性別、喫煙、飲酒、歯の本数を各調整因子による多変量解析を行い検討した。予後因子の検討では、術後1年以内の再発リスクとして検討を行った。

3) 統計解析

統計学的検定は4群間の比較ではKruskal-Wallis検定と多重比較検定 (Bonferroni法)、各群に有意な細菌の検出ではLEfSe解析、細菌分布割合の最適カットオフ値の決定はROC曲線の作成、単変量解析ではt検定とFisher's exact検定、多変量解析ではロジスティック回帰分析を行い、予後因子の検討にはKaplan-Meier法を用い、 p 値0.05未満を統計的に有意差ありとした。統計ソフトウェアにはR (version 3.4.0) を用いた。

III. 結果

1. Relative abundanceと4群間有意差

Relative abundanceでは、門レベルで *Bacteroidetes* 門 (29.5%)、*Firmicutes* 門 (28.9%)、*Proteobacteria* 門 (23.7%)、*Fusobacteria* 門 (10.5%)、*Actinobacteria* 門 (5.1%) の順に多かった。4群間の細菌割合の比較では *Streptococcus* 属と *Aggregatibacter* 属、*Alloprevotella* 属で有意差を認められた。

2. 細菌叢多様性の比較

4群に対するアルファ多様性解析においてHV群の多様性が最も高くなっていた。ベータ多様性解析では、概ね各群が一定の範囲内に分布しており、細菌叢が各群で異なることが確認された。

3. LEfSe解析

1) LEfSe解析結果

LDAスコアが高値を示したのは、OSCC群では *Fusobacteria* 門、*Fusobacterium* 属、*Bacteroidetes* 門で、OSCCなし群では *Firmicutes* 門、*Streptococcus* 属、*Veillonella* 属であった。

late 群と early 群の比較では、late 群で *Fusobacterium* 属や *Alloprevotella* 属、early 群で *Streptococcus* 属が高値を示していた。また、rec 群で *Fusobacteria* 門と *Fusobacterium* 属、non-rec 群で *Streptococcus* 属の LDA スコアが高値であった。

2) OSCC 関連候補細菌の選定

OSCC 群で有意な *Fusobacteria* 門、*Fusobacterium* 属および *Bacteroidetes* 門の割合の増加、*Firmicutes* 門と *Streptococcus* 属の割合の低下を認め、これらを OSCC 関連候補細菌と決定した。

4. 口腔扁平上皮癌関連候補細菌と診断カットオフ値

ROC 曲線から、それぞれの候補細菌の OSCC 診断カットオフ値が得られ、*Bacteroidetes* 門は解析から除外した。

5. 口腔扁平上皮癌診断・予後因子としての検討

OSCC の有無が *Bacteroidetes* 門以外の OSCC 関連候補細菌の診断カットオフ値と有意に関連していた。また、*Fusobacteria* 門の割合が 13.8% 以上を示した症例では術後 1 年以内の再発率が有意に高かった。

IV. 考察

1. 口腔細菌叢解析の意義、有用性

本研究は唾液検体を用いた口腔細菌叢の検討でOSCC群、OLK群、Post群、HV群間の細菌叢の相違、OSCC群に特徴的な細菌の割合の解析がOSCCの診断において有用である可能性を示した。採取が容易である唾液からの口腔細菌叢の解析がOSCC診断において臨床応用が可能であれば、早期診断のみならず予後予測に貢献すると考えられる。

2. 口腔扁平上皮癌における細菌の多様性

OSCCやOLKなどの疾患の存在やOSCC術後などの宿主の状態によって口腔内環境が変化し生存可能な細菌が限定された結果、細菌叢の多様性が低下し各群に特徴的な細菌叢が形成されたものと考えられた。

3. 新規の口腔扁平上皮癌診断・予後因子としての可能性

本研究では、OSCCを検出できる最適な診断カットオフ値を決定し、その診断カットオフ値とOSCCの関連性をみることで、OSCC診断における口腔細菌叢解析の有用性が示された。さらに、*Fusobacteria*門の割合が高値を示した症例で有意に再発率が高かったことは、予後因子としての可能性を示唆していた。

4. 口腔細菌と癌発生経路

口腔細菌が癌の発生や進展に関わる機序としては、慢性的な炎症を惹起

することによる免疫抑制、細胞周期への直接的あるいは間接的な干渉、発癌物質の産生、細胞アポトーシスの阻害、細胞増殖の活性化や細胞性浸潤の促進などがこれまでに指摘されている。

5. 唾液検体の特徴

唾液の採取は非侵襲的で簡便であることからOSCCを含めた疾患のスクリーニングに適していると考えられる。唾液の細菌叢は最も口腔内の状態を反映しており、その細菌叢は安定的で再現性が高いと報告されている。

6. 今後の課題と展望

今回は OSCC 群の生命予後の検討ができなかったが、今後も継続的に対象症例の追跡調査を行うことによって明らかとしたい。

V. 結語

本研究では、非侵襲的で簡便な唾液検体を用いた口腔細菌の解析が OSCC 診断において有用である可能性が示された。さらに、早期再発症例の細菌叢を解析することで、*Fusobacteria* 門や *Fusobacterium* 属の割合の増加が OSCC の予後増悪因子となる可能性が示唆された。