

論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙	第 号	論文提出者名	橋本健吾
論文審査 委員氏名	主査	長尾 徹	副査	野本周嗣 本田雅規 長谷川義明
論文題名	口腔扁平上皮癌に関連する口腔細菌叢解析の 有用性			

インターネットの利用による公表用

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多く、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の開発が喫緊の課題とされています。申請者は口腔細菌叢解析の臨床応用の可能性に着目し、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の検討を行ないました。これまでに口腔細菌叢解析の臨床的な意義やその臨床応用についてはほとんど検討されておらず、本論文の結果は新規の OSCC 診断バイオマーカ開発に寄与し、OSCC の早期発見だけでなく、プロバイオティクスの導入による予防治療など新たな治療戦略の確立につながることも考えられます。

本研究では 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口腔細菌叢を解析しました。細菌叢の変動を最小限とすべく、唾液採取時間を一定のタイミング (起床時、食事や歯磨き前) で行い、採取前 3 ヶ月以内の抗生剤内服や感染性疾患および他の悪性腫瘍を治療中の患者を除外しています。

細菌叢の解析は、唾液検体から DNA を抽出し細菌の 16S rRNA V4 領域を増幅し、次世代シーケンサにて網羅的に行なっています。細菌の系統推定を行うためのデータベースには口腔細菌の解析に最適化された Human Oral Microbiome Database を用いています。4 群 (OSCC 群、OLK 群、Post

群、HV 群) の細菌叢を比較検討するため、アルファ多様性およびベータ多様性解析を行いそれぞれの群の細菌叢の相違を明らかとしました。また、各群の比較で有意に異なる細菌を検出するために LEfSe (Linear discriminant analysis of effective size) による解析を行ないました。LEfSe 解析で抽出された細菌はその所属する群における有意な影響力を示すもので、生物学的に意味のある有力なバイオマーカ候補を検出するのに適しているとされます。申請者は、OSCC 群と OSCC なし群の比較によって OSCC 関連候補細菌を決定し、さらに OSCC 群の中で初期癌 (early 群) と進行癌 (late 群) 間や 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) 間の比較を行い OSCC の進行や予後に関連する細菌の検討も行ないました。

OSCC 関連候補細菌が OSCC 診断における有用性の検討では、候補細菌の割合によって OSCC 群と OSCC なし群を区別できる最適なカットオフ値を ROC 曲線から決定し、得られたカットオフ値について臨床因子を加えた統計解析を行なって評価している。また、術後 1 年以内の再発リスクを検討し、予後予測因子としての可能性を検証しています。

本研究で得られた知見は、以下の如くです。

細菌の門レベルにおいて、全サンプル中で優占割合が高かったのは *Bacteroidetes* (29.5%)、*Firmicutes* (28.9%)、*Fusobacteria* (10.5%) の順であり、4 群間の細菌分布割合に有意差を認めた。各群の細菌叢多様性は HV

群が最も高く、OSCC や OLK の存在や OSCC 術後などの宿主の状態によって生存可能な細菌が限定されることが示されました。また、LEfSe 解析によって *Fusobacteria* 門、*Fusobacterium* 属、*Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門、*Streptococcus* 属が OSCC 候補細菌として挙げられました。多変量解析の結果、*Bacteroidetes* 門を除いた各候補細菌カットオフ値が有意に OSCC の存在と関連すること、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いことが示されました。

唾液の採取は非侵襲的で簡便であることから OSCC を含めた疾患スクリーニングに適しており、唾液の細菌叢は口腔内の状態をよく反映しており、安定的で再現性の高いとされています。唾液は血液の最終産物であり、様々な腫瘍マーカーが血液と同等のレベルの検知が可能で、口腔以外の全身的な変化の検出に利用できる可能性が指摘されています。

結論として、本研究において、唾液検体を用いた口腔細菌叢の解析が OSCC の診断において有用である可能性を示し、*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ことは、口腔細菌と OSCC との関連性の解明や新たな OSCC 診断バイオマーカーの開発において重要な知見を有しております。よって、本研究は口腔外科学、外科学、および関連緒学科に寄与するところが大きく、博士（歯学）の学位授与に値するものと判定いたしました。