

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者 上田 整

論文題目

唾液中 mRNA NUS1 と RCN1 をバイオマーカーとした  
口腔扁平上皮癌のスクリーニング

## I. 緒言

口腔がんの最も頻度の高い組織型は口腔扁平上皮癌 (OSCC) である。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い。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喫緊の課題である。そこで、OSCC のスクリーニングが可能な簡便かつ信頼性の高いスクリーニング方法として、唾液が着目されている。

本研究は、唾液による OSCC 検出の新規バイオマーカーとして、mRNA である Nuclear undecaprenyl pyrophosphate synthase 1 homolog(*NUS1*) と Reticulocalbin 1(*RCN1*)に着目し、検証を行った。

## II. 対象および方法

### 1. 対象

2015年12月から2019年3月までの期間に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、健常ボランティア 10 例を対象とし、OSCC 患者から唾液と組織 (癌部組織と非癌部組織) を採取し、健常ボランティアからは唾液のみ採取した。OSCC 患者は全ての治療が開始されていない初発癌を対象とし、感染性疾患や他の悪性腫瘍を治療中の患者は研究対象から除外した。OSCC の原発部位の内訳は舌 17 例、歯肉 16 例、口底 5 例、頬粘膜 3 例で、癌のス

ページはI・II期 21 例でIII・IV期 20 例であった。

## 2. 検体採取および RNA 抽出

### 1) 組織検体の採取

OSCC 癌部組織は切除直後の腫瘍切片の中心部から採取し、非癌部組織は切除断端部から採取した。

### 2) 唾液検体の採取

唾液サンプルは、Oragene RNA Self-Collection kit (DNA Genotek Inc) を使用して収集した。

### 3) RNA の抽出

RNeasy Mini Kit のプロトコールに従って RNA を抽出し、QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いて cDNA に逆転写した。

## 3. マイクロアレイ

唾液検体においては、無作為に選んだ OSCC 患者 4 例と健常ボランティア 4 例を対象にし、組織検体においては、無作為に選んだ OSCC 患者 5 例から OSCC 癌部組織 5 例と非癌部組織 5 例を対象にマイクロアレイを施行した。唾液検体と組織検体のそれぞれで、OSCC 群で 2 倍以上の正の倍率変化を認めた遺伝子を抽出した。

## 4. リアルタイム定量 PCR

組織検体と唾液検体の全てを対象にリアルタイム定量 PCR を行った。RCN1、

*NUS1* の mRNA 発現レベルを Biosystems7500(Invitrogen)で評価した。内在性コントロールとして *GAPDH* を使用して mRNA レベルを正規化した。

## 5. 口腔扁平上皮癌診断・予後因子としての検討

### 1) *NUS1* と *RCN1* の診断カットオフ値の決定

唾液中の *NUS1* と *RCN1* の発現量によって OSCC 群と非 OSCC 群を区別できる最適な診断カットオフ値を ROC 曲線から決定した。カットオフ値の正確性は曲面下面積 (AUC)で判定した。

### 2) 診断因子としての検討

診断カットオフ値が有効であるかどうかについて、各群の年齢、性別、喫煙や飲酒状態などの因子で単変量解析を行って検討したが、いずれの因子とも関連がなかった。

### 3) 統計解析

診断カットオフ値の決定のために ROC 曲線を作成した。単変量解析では、t 検定と Fisher の正確確率検定を行った。2つの遺伝子の発現量の相関は、Spearman の相関係数を用いた。 $p$  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. 候補遺伝子の選択

マイクロアレイにより、組織サンプルと唾液サンプルから OSCC 群で 2 倍

以上の正の倍率変化を認めた mRNA をそれぞれ抽出した。その中で、唾液と組織で共通する mRNA は 9 種のみであった。本研究では、これらの mRNA の内、*NUS1* と *RCN1* の 2 つを OSCC スクリーニングのための新規バイオマーカー候補に選択した。

## 2. 組織での *NUS1* と *RCN1* の発現

*NUS1* と *RCN1* は共に、OSCC 癌部組織群と非癌部組織群に発現レベルの有意差は認めなかった。また、OSCC の病期を早期癌 (ステージ I と II) と進行癌 (ステージ III と IV) で発現量を比較したが、いずれも有意差を認めなかった。

## 3. 唾液での *NUS1* と *RCN1* の発現

OSCC 患者は健常ボランティアより有意に高い *NUS1* と *RCN1* の発現を認めた (*NUS1*:  $p = 0.037$ 、*RCN1*:  $p = 0.011$ )。さらに、OSCC の病期を早期癌 (ステージ I と II) と進行癌 (ステージ III と IV) で発現量を比較したが、いずれも有意差を認めなかった。

## 4. *NUS1* と *RCN1* を用いた OSCC スクリーニング

*NUS1* および *RCN1* の発現量による OSCC スクリーニングのカットオフ値を ROC 曲線から算出した。このカットオフ値をもとに OSCC スクリーニング検査の評価を行った。唾液 *NUS1* での精度は、感度 0.683、特異度 0.700、陽性的中率 0.903、陰性的中率 0.350 となり、OSCC の検出能力は高いが、

健常者が偽陽性となるリスクがあった。唾液 *RCNI* での精度は、感度 0.683、特異度 0.900、陽性的中率 0.966、陰性的中率 0.409 となり、*NUSI* より陽性的中率と陰性的中率は高いが、*NUSI* と同様に感度が 0.7 以下となったため *OSCC* スクリーニングとしては欠点があった。また、*NUSI* と *RCNI* の2つのマーカーの発現量に有意な相関は認められなかった (*Spearman* の順位相関係数 0.25、 $p = 0.077$ )。これら2つのマーカーを *OSCC* スクリーニングに併用した場合、感度 0.927、特異度 0.700、陽性的中率 0.927、および陰性的中率 0.700 となり、感度と陰性的中率は、いずれかのマーカーを単独で使用した場合よりも改善された。

#### IV. 考察

##### 1. *NUSI* について

*NUSI* は、*Nogo-B* 受容体としても知られており、主に末梢組織で発現している。*Nogo-B* は、*Nogo-B* 受容体に結合することで、内皮細胞の小胞体の走化性や形態形成に関与し、他臓器の癌に関与していることが知られている。

##### 2. *RCNI* について

*RCNI* は、小胞体に局在し、カルシウムイオン依存性の細胞接着に関与している。*RCNI* の過剰発現は、他臓器の癌との関連が報告されている。

##### 3. *NUSI* と *RCNI* の発現量について

*NUSI* と *RCNI* は、マイクロアレイ では癌部組織で高度に発現していた。

しかし、追加検証のために全症例で行ったリアルタイム定量 PCR の結果では、癌部組織と非癌部組織を比較しても有意差はなかった。

唾液において、*NUSI* と *RCNI* は、マイクロアレイと同様に、OSCC 患者の唾液で高度に発現されるが健常者の唾液では低度であることが明らかになった。

以上より、唾液と組織での発現量の傾向が異なることから、唾液中の *NUSI* と *RCNI* の mRNA の変化は、何らかの環境因子に起因する可能性が考えられた。

#### 4. OSCC のスクリーニングについて

唾液中の *NUSI* や *RCNI* の発現量を調べることにより、OSCC のスクリーニングができる可能性が示唆されたが、*NUSI* も *RCNI* も OSCC の病期の進行とは関係のない発現量であったため、早期癌か進行癌かの鑑別まではできなかった。唾液 *NUSI* スクリーニング検査での OSCC スクリーニングは、OSCC の検出能力が高いが、健常者が偽陽性となるリスクも高く、OSCC スクリーニングとしては満足いく結果ではなかった。唾液 *RCNI* スクリーニング検査での OSCC スクリーニングの精度は、唾液 *NUSI* スクリーニング検査より少し精度が上であったが、やはり陰性的中率に欠点があった。

そこで我々は、唾液中の *NUSI* と *RCNI* の発現量には相関がないため、両方の検査で陰性であれば陰性的中率が向上すると考えた。2つのマーカーを

併用したスクリーニングを検証したところ、検査の精度は、特異度と陽性的中率の精度を保ち、感度と陰性的中率が向上した。

## 5. 唾液検体の特徴

唾液の採取は非侵襲的で、患者自身で採取できることから 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で検知されており、口腔以外の全身的な変化の検出にも利用できる可能性がある。

## 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。また、口腔潜在的悪性疾患 (OPMD) の発癌リスクについても、OPMD 患者の唾液サンプルから長期的に回収して、さらなる調査を行う予定である。

## V. 結語

唾液の採取はキットを使用することにより誰でも容易に採取することができるため、OSCC スクリーニングの試料として有用である。今回我々は、唾液中の *NUSI* と *RCNI* の2つのバイオマーカーを併用した OSCC のスクリーニング検査の有用性を見出した。