

主論文の要旨

**Detection of serum/salivary exosomal Alix in patients with
oral squamous cell carcinoma**

（ 口腔扁平上皮癌患者の血清および唾液中の
エクソソームに含まれる Alix の検出 ）

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

（指導：日比 英晴 教授）

中道 瑛司

【緒言】

日本では年間 7,000 人以上報告される口腔がん新規症例の 9 割を口腔扁平上皮癌 (Oral squamous cell carcinoma, OSCC) が占め、死亡率も高いため診療成績改善が求められている。通常 OSCC の診断は試験採取した腫瘍組織パラフィン切片の病理組織学検査で下される。本法が OSCC を確定診断する力は強いが、同時に組織採取術者・病理診断医の熟練への依存度が高く侵襲性や医療コストも高い。そのため、侵襲性が低く簡便に高い特異度と陽性的中率が得られる腫瘍マーカーが待ち望まれている。腫瘍マーカーは、悪性細胞によって直接産生されるか悪性細胞に応答して他の細胞によって生産される物質である。腫瘍マーカーは、疾患のスクリーニング、早期発見、診断確認、再発のモニタリングすべてができることを理想とするがそのような腫瘍マーカーは少ない。エクソソームはあらゆる体液から回収可能な直径 30-100 nm の細胞外小胞であり、起源となる細胞の細胞質や細胞膜を反映したタンパク質、脂質、mRNA、miRNA を含有している。Human Alix/Programmed cell death 6-interacting protein (*PDCD6IP*) は全身に発現する細胞質タンパクである。Alix mRNA はあらゆるヒトがん組織に発現し上部消化管癌や前立腺癌の腫瘍マーカーの候補として選抜されたことがある。しかし OSCC 患者の体液から得られたエクソソームで Alix が測定されたことはない。今回、血清および唾液中のエクソソームに含まれる Alix (exoAlix) が OSCC の診断マーカーとして利用できる可能性について検討した。

【方法】

2017 年 11 月から 2019 年 7 月の間に当科を受診し手術を行った OSCC 患者 31 例 (OSCC 群) と OSCC 以外の疾患患者 26 例 (HC 群) から血清および唾液を回収した。血清は、OSCC 群から術前 1 回と術後 2 週後に 1 回ずつそれぞれ 1 mL、HC 群からは 1 回 1 mL を回収した。唾液は OSCC 群から術前に 1 回 1 mL 回収し、HC 群から 1 回 1 mL 回収した。血清および唾液 1 mL から超遠心分離法によりエクソソームを回収し、粒径測定、電子顕微鏡、ウェスタンブロット法にて評価した。ELISA 法にてエクソソーム中の Alix 濃度 (exoAlix 値) を測定した。測定した exoAlix 値をもとに Receiver operating characteristics (ROC) 曲線を作成し血清および唾液の exoAlix 値のカットオフ値を決定した。切除 OSCC 組織における Alix の発現を免疫組織化学染色により評価した。本研究は名古屋大学大学院医学系研究科・医学部附属病院生命倫理審査委員会の承認を得た上で行った。

【結果】

エクソソーム抽出法の検定

OSCC 群および HC 群の内訳を示す (Fig 1A, B)。OSCC 群および HC 群の血清および唾液から超遠心分離法にて回収した微小粒子はエクソソームであることが確認された (Fig 1C-G)。

血清 exoAlix の測定

OSCC 群と HC 群の血清 exoAlix 値を比較したところ exoAlix は OSCC 群において有意に高値を示した(Fig 2A)。OSCC 群を各 Stage や頸部リンパ節転移の有無で分類したところ Stage III 群や頸部リンパ節転移を認めた群では HC 群と比較し血清 exoAlix が有意に高値であることがわかった(Fig 2B, C)。一方、OSCC の原発発生部位別の血清 exoAlix 値に HC 群との差は認めなかった(Fig 2D)。同一血清サンプルによる exoAlix の ELISA 法とウェスタンブロットのデンシトメトリー法は同様の定量結果を示した(Fig 2E)。OSCC の手術前後での血清 exoAlix を比較したところ、血清 exoAlix は術後に有意に低下した(Fig 2F)。

唾液 exoAlix の測定

OSCC 群では HC 群と比較し唾液 exoAlix が有意に高値を示すことがわかった(Fig 3A)。しかし血清で示されたような各 Stage や頸部リンパ節転移との関係は得られなかった(Fig 3B, C)。また血清同様、唾液 exoAlix と原発発生部位との関係は得られなかった(Fig 3D)。唾液 exoAlix においても ELISA 法とウェスタンブロット法は同様の定量結果を示した(Fig 3E)。

切除組織での Alix 発現

免疫組織化学染色にて Alix が癌本体に発現していることを確認したが、Alix は健全な舌の重層扁平上皮においても発現が確認された(Fig 4A)。癌本体での発現と血清 exoAlix と唾液 exoAlix の発現量に相関は得られなかった(Fig 4B)。測定した exoAlix 値を用いて ROC カーブ解析を行い、検査の優秀性判定と最適なカットオフ値の設定を行った。ROC カーブの曲線下面積 (Area under the curve :AUC) は、血清 exoAlix では 0.685、唾液 exoAlix では 0.712 であった。カットオフ値での (感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、有意差) は血清 exoAlix が (0.345, 1.000, 1.000, 0.525, 0.027)、唾液 exoAlix は (0.348, 1.000, 1.000, 0.5714, 0.0176) であった。以上より、血清 exoAlix および唾液 exoAlix は中等度の検査能力 (AUC~0.7) を示し、感度は 0.35 付近とそれほど高く無かったが、高い特異度 (1.000) と陽性的中率 (1.000) を示した(Fig 4C, D)。

【考察】

本研究は、血清/唾液 exoAlix が OSCC の新規腫瘍マーカーになり得る可能性を示唆している。血清/唾液 exoAlix はカットオフ値での感度は 35% 付近と低いため早期発見やスクリーニングには適さないが特異度と陽性的中率に優れ、さらに血清 exoAlix は術後に有意に低下することから治療効果判定に応用できる可能性が示唆された。OSCC は再発率が高い疾患であるため今後再発モニタリングマーカーとして利用できる可能性がある。全ての OSCC 切除組織に Alix の発現を確認したことから、大部分の Alix は OSCC 組織からエクソサイトーシスにより直接的に血液あるいは唾液中に放出されていると考えられるが確定には更なる検討が必要である。今後 exoAlix が臨床応用されるためには、exoAlix と性別、年齢、全身状態 (飲酒、喫煙、肝疾患、腎疾患、肥満等)、口腔以外の扁平上皮癌や他の悪性腫瘍との関連や生物学的半減期を検討する必要がある。

本研究において血清/唾液 exoAlix を OSCC の新規腫瘍マーカーとして同定した。血清/唾液 exoAlix は OSCC のスクリーニングや早期発見には適さないが、このうち血清 exoAlix は治療効果の予測に適している可能性が示された(Fig 4E)。

【結語】

本研究は血清/唾液 exoAlix が高い特異度や陽性的中率を持つ OSCC の新規腫瘍マーカーである可能性を示した。