

# 論文内容要旨

## 口腔癌患者における腸内ならびに 口腔内細菌叢の多様性解析

主指導教員：岡本 哲治 教授

(医歯薬保健学研究科 分子口腔医学・顎顔面外科学)

副指導教員：宿南 知佐 教授

(医歯薬保健学研究科 生体分子機能学)

副指導教員：虎谷 茂昭 准教授

(医歯薬保健学研究科 分子口腔医学・顎顔面外科学)

松井 健作

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 研究目的

ヒトの腸管内には約 1000 種類、総数 100 兆個に及ぶ腸内細菌が共存しており、腸内細菌叢は実質的な臓器とも呼ばれている。腸内細菌が産生する代謝産物は全身の代謝系や免疫系に影響を与えており、腸内細菌叢の細菌種の構成の異常(dysbiosis)は癌や種々の疾患の発症、進展に関与していることが明らかにされつつある。また、口腔常在菌叢は歯周病やう蝕などの感染症に関与するだけでなく、腸内細菌叢や全身疾患との関連性が指摘されてきているが、その詳細は不明の点が多い。申請者の所属する研究室では、口腔癌患者が治療期間中に発酵食品ケフィアを摂取することで肝機能障害予防効果や予後改善効果が得られることを明らかにしてきた。

本研究では、口腔扁平上皮癌患者の口腔ならびに腸内細菌叢と、癌免疫や臨床病態との関係を明らかにするために、口腔癌患者および健常人の口腔ならびに腸内細菌の 16SrRNA の T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism) 解析を行った。さらに、癌微小環境における癌免疫様態を明らかにするために、口腔扁平上皮癌組織における免疫チェックポイント関連分子の発現を免疫組織学的に検討し、臨床病態や生存率との相関について明らかにした。また、これら関連分子の発現と腸内細菌叢との関連性について検討し、相関性を示した細菌群が主に産生する短鎖脂肪酸の、扁平上皮癌細胞における PD-L1(programmed cell-death ligand 1)遺伝子ならびに蛋白発現に与える影響について検討した。

## 研究方法

2001 年 1 月から 2013 年 9 月までの間に広島大学病院顎・口腔外科にて主として外科的治療を行なった口腔扁平上皮癌 210 例のうち、試験切除標本に対して免疫組織学的解析が可能であった 72 例を対象に、免疫チェックポイント関連分子 PD-L1, PD-1 の発現を免疫組織学的に検討し、Tanaka らの方法に準じて評価した。PD-L1 発現, PD-1 発現をそれぞれ陽性群と陰性群に分類し、これら分子の発現と臨床病態因子や生存率との関係をレトロスペクティブに検討した。陰性群と陽性群間における臨床病態因子および生存率との統計学的検討は Kaplan-Meier 法で行い、生存率の有意差は log-rank 検定で行った。

2016 年 11 月から 2017 年 9 月までの間に広島大学病院顎・口腔外科で加療を行った口腔扁平上皮癌患者 18 名(平均年齢 65 歳, 男性 10 名, 女性 8 名)および健常人 7 名(平均年齢 60.7 歳, 男性 4 名, 女性 3 名)を対象に、臨床研究「口腔癌患者と健常人における腸内細菌叢ならびに口腔内細菌叢の比較検討(疫受-1979)」および「ケフィアの摂取による口腔癌患者の口腔細菌叢ならびに腸内細菌叢の変動と臨床経過に関する臨床研究(許可番号 C-102)」にもとづき同意を得た後、未治療時に口腔内プラークと大便を採取し、T-RFLP 法による細菌叢解析を行った。また、口腔癌患者群の生検口腔癌組織における PD-L1, PD-1 の発現を免疫組織学的に検討し、腸内ならびに口腔内細菌叢との関連性を明らかにした。

上記検討で関連性が明らかとなった口腔ならびに腸内細菌群が産生する短鎖脂肪酸である、コハク酸, 酢酸, プロピオン酸, 酪酸の無血清培養下での扁平上皮癌細胞株 A431 における PD-L1 遺伝子ならびに蛋白発現に与える影響を定量 PCR 法, Western blotting 法および蛍光免疫染色

法で検討した。

## 結果

口腔扁平上皮癌 72 例中, PD-L1 陽性群は 22 例, 陰性群は 50 例であった。5 年生存率はそれぞれ 55.5%, 80.3%で, PD-L1 陽性群は陰性群に比べ有意に予後不良であった。2 群間の T 分類, N 分類及び Stage 分類には統計学的な有意差は認めなかった。また, 多変量解析の結果, 腫瘍原発巣の大きさ, リンパ節転移, Stage の進行度と PD-L1 発現は独立した予後不良因子であることが明らかとなった。一方, PD-1 発現はいずれの因子とも相関を示さず, 有意な予後不良因子ではなかった。

口腔癌患者群(18 名)と健常人群(8 名)における口腔および腸内細菌叢の細菌占有率を主成分分析で解析した結果, 健常人群と口腔癌患者群の口腔および腸内細菌叢は異なるクラスターを形成していた。さらに, これら患者の口腔癌組織における PD-L1 ならびに PD-1 の発現を免疫組織学的に検討した結果, PD-L1 陽性群は 5 例, PD-L1 陰性群は 13 例, PD-1 陽性群 6 例, PD-1 陰性群 12 例であった。PD-L1 陽性群では腸内細菌叢の *Clostridium* subcluster XIVa の占有率が有意に高く, PD-1 陽性群では腸内細菌叢の *Clostridium* cluster IV の占有率, および口腔内細菌叢の *Parvimonas* の占有率が有意に高いことが明らかとなった。

さらに, A431 細胞における *PD-L1* 遺伝子発現は, プロピオン酸(1.0mM)および酪酸(0.5mM)により促進された。

## 考察

口腔癌患者の腸内ならびに口腔内細菌叢の各細菌占有率は, 健常人のそれらと異なるクラスターを示し, *dysbiosis* の状態であることが明らかとなった。また, 口腔扁平上皮癌組織における免疫チェックポイント分子 PD-L1 の発現は予後不良因子として機能しており, PD-L1 や PD-1 の発現と, *Clostridium* subcluster XIVa や *Clostridium* cluster IV などの特定の腸内細菌群とは有意な関連性があることが明らかとなった。さらに, これら細菌が産生する短鎖脂肪酸は癌微小環境での免疫チェックポイント分子の発現動態を制御することで, 臨床病態や予後に影響を与えていることが示唆された。口腔癌の発症や病態における疾患特異的な腸内および口腔内細菌叢の重要性が明らかとなったことから, これら細菌叢を標的とした新たな癌治療の可能性が考えられた。