

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08954

研究課題名(和文) 早期食道癌のゲノム・エピゲノムの網羅的解析と内視鏡洗浄廃液による分子診断の開発

研究課題名(英文) Genome and epigenome analysis of early esophageal cancer and the development of molecular diagnosis using endoscopic wash

研究代表者

篠村 恭久 (Shinomura, Yasuhisa)

札幌医科大学・その他部局等・名誉教授

研究者番号：90162619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：今回の検討でFusobacterium属は早期食道癌(扁平上皮癌)の組織に存在することが明らかとなった。またその陽性群は脈管侵襲陽性例が多い傾向が認められたことから生物学的悪性度に関与する可能性も示唆された。
このように早期食道癌を用いてゲノム解析で同定された微生物種とその分子異常、さらに環境因子との関連を検討することは、将来的に新たな予防法や診断・治療法に繋がる可能性があり、消化器癌の新たな治療戦略を世界に先駆けて報告できるものと思われる。よって内視鏡検査時の食道洗浄廃液を用いた早期食道癌のmicrobiome解析など更なる発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the current study, Fusobacterium species was detected in early esophageal cancer (squamous cell carcinoma) tissues. In addition, the positive group was significantly associated with lymphovascular invasion, suggesting its relation with biological malignancy. Thus, our data suggest that tumor Fusobacterium species is a promising biomarker of esophageal cancer and could open up exciting opportunities to improve our understanding of the pathogenesis of this disease. Moreover, our findings should help to elucidate the details of carcinogenesis and could lead to the development of a new diagnostic (i.e., esophageal wash) for patients with esophageal cancer.

研究分野：消化器癌の分子異常

キーワード：食道癌 エピゲノム Fusobacterium

1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌は喫煙や飲酒歴がその主な危険因子とされているが、欧米と比べ、わが国を含むアジア地域に頻度が高い。また食道癌の一部の症例ではそれらのリスク因子がない例も存在し、異なった分子病理学的背景や環境因子をもとに発生する可能性が考えられる。近年、腸内の常在微生物群ゲノム (microbiome) 解析が可能になり、消化器発癌との関連や腫瘍内へのリンパ球浸潤等の免疫応答や生活様式等の環境因子により影響を受けることが明らかになりつつある。よって食道においても常在微生物種が存在し、発癌にも関与している可能性が考えられている。

食道癌の治療は内視鏡的・外科的切除だけでなく放射線・化学療法も含めた集学的治療が行われるが、その感受性はすべての食道癌で一定ではなく、その効果が乏しい症例もみられる。従って食道癌の中には異なった分子異常を呈する群が存在する可能性があるが、その原因となるゲノム、エピゲノムの異常はほとんど明らかにされていない。よってそのメカニズムを解明することは食道癌の個別化治療に繋がること期待され、さらに特異的な分子異常を同定できれば診断や治療の標的だけでなく、リスク群の同定にもつながる可能性がある。また関連する常在微生物種が発見できればその発癌予防に貢献できる可能性がある。そこで食道扁平上皮癌の病態を解明する手段として、その初期病変である早期食道癌の分子異常の網羅的解析と常在微生物種の解析が重要であると考えられる。

2. 研究の目的

近年、我が国では食道・胃・大腸の早期癌に対する治療として内視鏡的粘膜下層剥離術 (Endoscopic Submucosal Dissection、以下 ESD) が普及しつつある。ESD は病変を周囲粘膜も含めて一括切除できるため、その発生初期の病理組織学的所見だけでなく、分子異常や微生物ゲノムを解析するのにも十分な組織検体を得られるというメリットがある。よって内視鏡的に完全一括切除された多症例の早期食道癌の臨床検体を用い、それらの分子異常 (遺伝子変異、DNA メチル化・ヒストン修飾等のエピジェネティックな異常や microRNA 発現等) や疾患に関連する常在微生物種を明らかにすることはその病態解明に重要と考えられる。

3. 研究の方法

今回、我々は ESD で一括切除された多症例の早期食道癌を利用して常在微生物群ゲノム解析を計画。さらに癌の分子異常として

ChIP-seq や microRNA アレイ等に加え、同定された食道癌の常在微生物種とゲノム、エピゲノムの分子異常や生活習慣との関連を検討する。

4. 研究成果

1) 本研究を成し遂げるにあたり、ホルマリン固定標本からでも凍結標本と同程度の品質で 16S rDNA シークエンスによる microbiome 解析を可能とすることが必要であった。よって我々と協力体制にあるダナファーマー癌研究所 (アメリカ合衆国マサチューセッツ州) と連携し、DNA 抽出方法やプライマーの選択などを検討した結果、適切なプロトコルが完成した。その結果としてヒトの口腔内や腸内に常在細菌であり、大腸発癌への関与が指摘されているグラム陰性桿菌の *Fusobacterium* 属が食道癌患者の正常粘膜と比較して癌組織で多く発現していることが明らかとなった。

2) 我々は ESD で切除した早期食道癌 65 例の臨床検体からの DNA を抽出し、定量的 PCR 法を用いてその発現頻度を検討。その結果、早期食道癌の 62% で *Fusobacterium* 属が検出された。今回我々は食道癌以外に、胃癌、大腸癌、膵癌、胆道癌などでも癌組織における *Fusobacterium* 属の発現頻度を検討したが、食道癌での発現頻度が最も高かった。

3) 遺伝子変異解析の結果、KRAS 遺伝子変異は 0%、BRAF 遺伝子変異は 0%、PIK3CA 遺伝子変異は 2.5% で検出されたが、いずれの変異も *Fusobacterium* 属との関連性は認められなかった。

4) エピジェネティックな異常やマイクロサテライト不安定性 (MSI) に関しては、MLH1 メチル化は 7.5%、MSI 陽性は 0% であったが、*Fusobacterium* 属との関連性は認められなかった。

5) *Fusobacterium* 属が陽性の早期食道癌では有意差はないが、脈管侵襲陽性の癌が多い傾向があったが ($P = 0.08$)、喫煙や飲酒歴との関連性は認められなかった。

6) 上部消化管内視鏡検査時の食道洗浄廃液を用いた検討では、癌組織の DNA と RNA は抽出可能であったが、*Fusobacterium* 属の検出には至らず、今後は検出プライマーの改良など更なる解析が必要と考えられた。また癌組織からの DNA と RNA を用いた非侵襲的な分子診断方法は現在、食道癌の早期発見を目指し、前向きな検討を進めているところである。

今回の検討で *Fusobacterium* 属は早期食道癌 (扁平上皮癌) の組織に存在することが明

らかとなった。またその陽性群は脈管侵襲陽性例が多い傾向が認められたことから生物学的悪性度に関与する可能性も示唆された。最近の進行食道癌の報告でも同様に Fusobacterium 属陽性群は不良な予後と相関し、CCL20 などのケモカインの活性化に寄与することが報告されていることから、我々の解析結果は合致している。

このように早期食道癌を用いてゲノム解析で同定された微生物種とその分子異常、さらに環境因子との関連を検討することは、将来的に新たな予防法や診断・治療法に繋がる可能性があり、消化器癌の新たな治療戦略を世界に先駆けて報告できるものと思われる。よって内視鏡検査時の食道洗浄廃液を用いた早期食道癌の microbiome 解析など更なる発展が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

- (1) Mitsuhashi K, Nosho K, Sukawa Y, Matsunaga Y, Ito M, Kurihara H, Kanno S, Igarashi H, Naito T, Adachi Y, Tachibana M, Tanuma T, Maguchi H, Shinohara T, Hasegawa T, Imamura M, Kimura Y, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of Fusobacterium species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis. Oncotarget. 2015;6:7209-20. 査読有
- (2) Mitsuhashi K, Yamamoto I, Kurihara H, Kanno S, Ito M, Igarashi H, Ishigami K, Sukawa Y, Tachibana M, Takahashi H, Tokino T, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Yamamoto H, Nosho K. Analysis of the molecular features of rectal carcinoid tumors to identify new biomarkers that predict biological malignancy. Oncotarget. 2015;6:22114-25. 査読有
- (3) Kurihara H, Maruyama R, Ishiguro K, Kanno S, Yamamoto I, Ishigami K, Mitsuhashi K, Igarashi H, Ito M, Tanuma T, Sukawa Y, Okita K, Hasegawa T, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y, Nosho K. The relationship between EZH2 expression and microRNA-31 in colorectal cancer and the role in evolution of the serrated pathway. Oncotarget. 2016;7:12704-17. 査読有

- (4) Nosho K, Sukawa Y, Adachi Y, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, Kanno S, Yamamoto I, Ishigami K, Igarashi H, Maruyama R, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of Fusobacterium nucleatum with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2016;22:557-66. 査読有

- (5) 能正勝彦, 須河恭敬, 三橋慧, 仲瀬裕志. 大腸癌のゲノム・エピゲノム異常に基づいた発癌経路の解明とライフスタイル・腸内微生物との関連. 日本消化器病学会雑誌 2016 年 113 巻 第 11 号 1878-86. 査読無

[学会発表](計 3 件)

- (1) 伊藤美樹, 能正勝彦, 五十嵐央祥, 三橋慧, 栗原弘義, 菅野伸一, 田沼徳真, 高橋宏明, 鈴木拓, 山本博幸, 篠村恭久. 早期食道腺癌における喫煙と DNA メチル化異常との関連. 第 65 回日本体質医学会総会(奨励賞受賞演題). 2015.7.4-5. 札幌
- (2) 菅野伸一, 須河恭敬, 能正勝彦. 消化器癌の臨床検体を利用した常在微生物群ゲノム解析と分子異常との関連の検討. 第 102 回日本消化器病学会総会. 2016.4.21-23. 東京
- (3) Nosho K, Sukawa Y, Kanno S, Yamamoto I, Ishigami K, Mitsuhashi K, Ito M, Kurihara H, Yamamoto H, Shinomura Y, Nakase H. Association of Fusobacterium species in Japanese gastrointestinal cancers with tumor molecular abnormalities and prognosis. The 75th Annual meeting of the Japanese cancer association. 2016.10.6-8. Yokohama.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠村 恭久 (Shinomura Yasuhisa)

札幌医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：90162619

(2) 研究分担者

能正 勝彦 (Nosho Katsuhiko)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：10597339

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()