

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08957

研究課題名(和文)メタゲノム解析によるバレット食道発癌過程におけるマイクロバイオータの関与

研究課題名(英文)Role of microbiota in the development of adenocarcinoma in Barrett's esophagus

研究代表者

藤原 靖弘 (FUJIWARA, Yasuhiro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40285292

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)：バレット食道からの腺癌発生は炎症性発癌であり、近年大腸癌で指摘されているように消化管内の細菌の関与が示唆される。ラットモデルを用いて抗生物質投与による食道細菌叢の変化が発癌に及ぼす影響を検討した。抗生物質投与により明らかな食道細菌叢の変化を来した(Lactobacillalesの低下、Clostridium cluster XIVa and XVIIIの増加)。しかし、食道腺癌の発生率はコントロール群89%、抗生物質投与群71%と有意差を認めなかった。以上より食道細菌叢の変化は食道腺癌の発生に影響を及ぼさないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation-associated cancer is relevant to microbiome. We investigated whether alteration of microbiome using antibiotics affects the development of esophageal adenocarcinoma in a rat model. All rats in control and antibiotics-group developed Barrett's esophagus. Incidence of esophageal adenocarcinoma was similar between both groups with a trend to reduced incidence in the antibiotics group (89% in the control group versus 71% in the antibiotics group, $P = 0.365$). T-RFLP analysis showed that esophageal microbiome was different between two groups such as the proportion of Lactobacillales was lower in the antibiotics group and Clostridium cluster XIVa and XVIII was higher in the antibiotics group. In conclusion, alteration of microbiome does not affect the incidence of esophageal adenocarcinoma. Microbiome may not contribute to the development of esophageal adenocarcinoma.

研究分野：消化器内科

キーワード：バレット食道癌

1. 研究開始当初の背景

バレット食道は下部食道粘膜が重層扁平上皮から円柱上皮および腸上皮化生に置換された状態であり、慢性的な胃酸や胆汁などの食道への逆流によって引き起こされる炎症が原因である。バレット食道は食道腺癌の前癌病変と考えられており、ヘリコバクター・ピロリ感染の減少や食生活の欧米化などで GERD 患者数が増加の一途をたどっている本邦でも、今後バレット食道癌が増加する可能性が高い。バレット食道の発癌には様々な要因が報告されているが、詳細なメカニズムは十分に解明されていない。

近年、次世代シーケンサー (NGS) の登場によって一度に大量の DNA 配列を解読可能となり、マイクロバイオームの解析は飛躍的な進歩を遂げている。分子生物学的手法を用いることで、難培養菌を多く含む腸内細菌の詳細な解析も可能となってきており、最近では NGS を用いた全ゲノム解析や 16S 解析が一般的である。その進歩に伴い消化管領域の悪性腫瘍とマイクロバイオームの関係について多数の研究が行われており、大腸癌や炎症性腸疾患において *pks+* *E. coli* や *Fusobacterium nucleatum* などの細菌の関与が報告されている。*in vitro*において *E. coli* がヒト腸管上皮細胞の DNA を傷害することが報告され、発癌を引き起こす可能性があることが示された。また炎症性発癌についてマウスを用いた研究が行われ、腸管の炎症によってマイクロバイオームが異常な状態に変化し (dysbiosis)、さらに宿主の粘膜防御能を低下させることで発癌作用のある細菌をより上皮内へと侵入させ発癌を促進することが示唆されている。

バレット食道癌は胃酸逆流などによる慢性炎症が原因で起こるバレット食道を母地として発生する炎症性発癌であり、発癌過程にマイクロバイオームが関与している可能性は十分に考えることができる。

ヒトの食道生検組織を用いた正常食道と逆流性食道炎、バレット食道のマイクロバイオームのメタゲノム解析によって、正常細菌叢でグラム陽性菌優位であるのに対して、逆流性食道炎、バレット食道でグラム陰性菌が優位になっていることが報告されている。増加したグラム陰性菌によって主に産生される lipopolysaccharides (LPS) による Toll-like receptor 4 を介した IL-1 や IL-6、IL-8、TNF- α などの炎症性サイトカインの発現量増加や、LPS 暴露による NF- κ B 活性化で起こる炎症性サイトカインや COX-2、inducible nitric oxide synthase (iNOS) の発現量増加がバレット食道からの発癌に寄与している可能性があるとされており、細菌叢の変化は酸逆流による 2 次的な変化ではなく食道における dysbiosis の可能性がある。

2. 研究の目的

食道への慢性の酸逆流によって下部食道に慢性炎症が引き起こされ、バレット食道が形成される。欧米における食道癌で半数を占める食道腺癌はバレット食道を母地として発癌するが、近年消化管癌、特に大腸癌においてマイクロバイオームの関与が報告されている。慢性炎症によってマイクロバイオームが変化し、有害な細菌が増加 (dysbiosis) することで消化管粘膜上皮の DNA が傷害され発癌を引き起こすことが推測されており、炎症性発癌であるバレット食道癌においてもマイクロバイオームが関与している可能性がある。動物モデルを用いてバレット食道発癌過程におけるマイクロバイオームの関与を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) ラット食道腺癌モデル作成およびプロトコール

7 週齢の雄性 Wistar ラットを用いた。食道空腸吻合によって胃十二指腸液が逆流し、バ

レット食道及び食道腺癌が発生するモデル (Levart 変法) を用いた。術後 21 週に通常の飲水を継続するコントロール群 (n = 21) と抗生物質を含む水を自由飲水する抗生物質群 (n = 22) に分け、術後 40 週に屠殺し、バレット食道および食道腺癌の発生率を組織学的に検討した (図 1)。

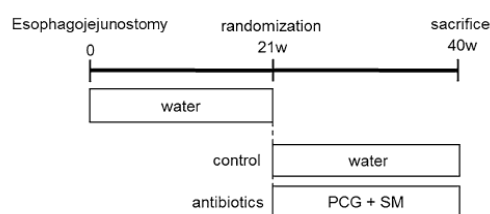


図 1. 実験プロトコール

(2) 抗生物質投与による非選択的消化管除菌

抗生物質を含む飲料水を1週間自由飲水させ、トライツ靱帯より4cm肛門側の近位空腸を採取し、細菌の16SrDNAコピー数を定量した。抗生物質は、1) 抗生物質なし (コントロール群)、2) ペニシリン 2 g/L + ストレプトマイシン 4 g/L (PCG + SM群)、3) アンピシリン 1 g/L + ネオマイシン 1 g/L + メトロニダゾール 1 g/L + バンコマイシン 500 mg/L (ABPC+NM+MNZ+VCM群)、4) バンコマイシン単独 500 mg/L (VCM群) に分けた。

(3) 食道腺癌発癌率の比較

術後 40 週でコントロール群、抗生物質投与群を sacrifice し、吻合部を含め食道を摘出する。摘出標本は長軸に 3~4 分割した後ホルマリン固定・パラフィン包埋し、薄切を行って HE 染色にて腺癌の有無を確認する。必要に応じて p53 などの免疫染色を追加した。

(4) 食道マイクロバイオータの解析

吻合部付近の食道より DNA を抽出し、T-RFLP 法を用いて細菌叢の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 抗生物質による腸内細菌数は PCG+SM 群及び AMPC+NM+MTZ+VCM 群で有意に減少した (図 2)。VCM 単独では有意な菌数の変化は観察できなかった。AMPC+NM+MTZ+VCM では飲水量が少ないことから本研究では PCG+SM を投与することとした。

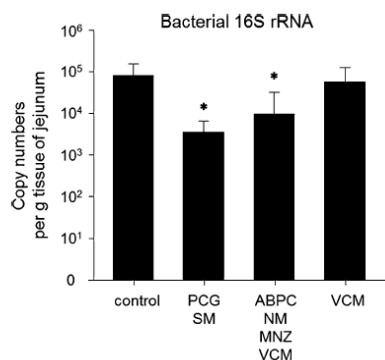


図 2. 抗生物質が腸内細菌数に及ぼす影響

(2) 生存率はコントロール群と抗生物質群で有意差は認めなかった。体重は 21 週では有意差を認めなかったが、40 週では抗生物質群で有意に増加していた。バレット食道 (腸上皮化成を伴う円柱上皮化生) は全個体に発生していたが、食道腺癌の発生率は両群で有意差を認めなかった (コントロール群 89%、抗生物質群 71%、 $P = 0.365$) (図 3)。

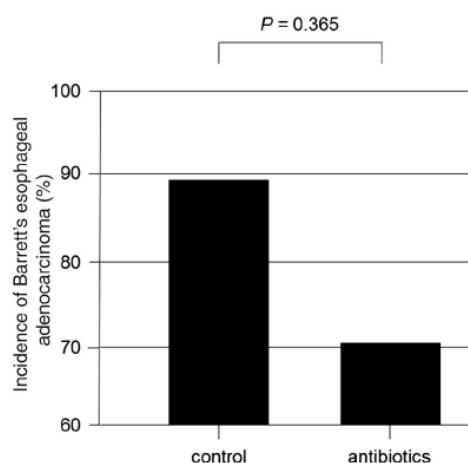


図 3. 食道腺癌発生率

組織学的には粘液産生を伴う腺癌が確認された(図4)

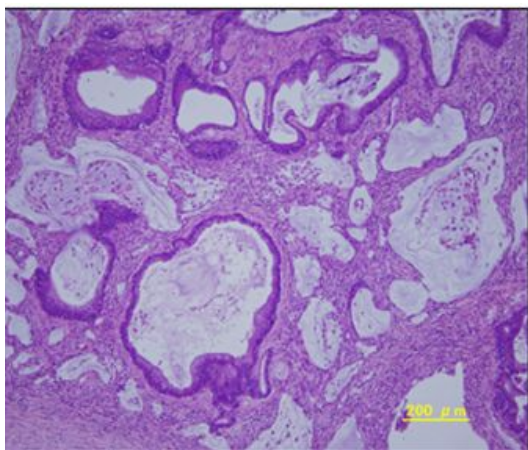
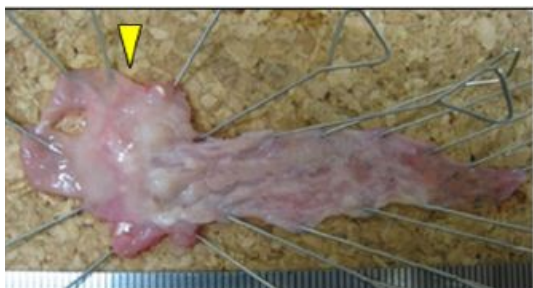


図4. 食道腺癌肉眼像・組織像

(3) T-RFLP解析では両群で食道細菌叢は異なっており、抗生物質群で *Lactobacillales* の割合が減少し *Clostridium* cluster XIVa および XVIII の割合が増加していた(図5)

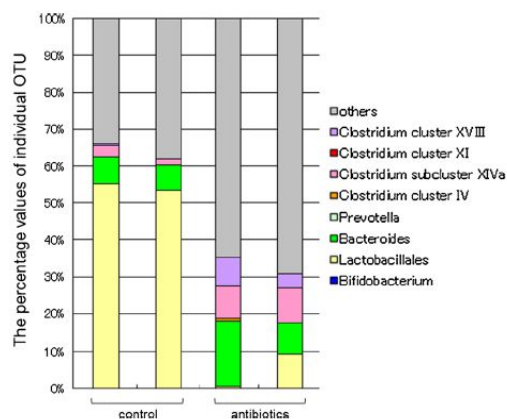


図5. 抗生物質による食道細菌叢に及ぼす影響

(4) 考察

今回、抗生物質投与群で食道腺癌の発生率が少し低かったが、有意差には至らなかった。仮

に抗生物質投与による食道 dysbiosis 改善が発癌抑制に関与するならば、抗生物質投与により体重増加を来し、逆流を増強して発癌に促進的に作用して発癌抑制効果がマスクされた、抗生物質の用量や種類、投与期間が発癌抑制には十分ではなかった、食道細菌叢は変化したものの発癌に関連する細菌には影響を変化させなかったなどの可能性が示唆された。

(5) 結論

以上より、抗生物質による食道細菌叢の変化は食道腺癌の発生に影響を及ぼさないことが示唆された。

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40件)

1. Uemura R, Murakami Y, Hashimoto A, Sawada A, Otani K, Taira K, Hosomi S, Nagami Y, Tanaka F, Kamata N, Yamagami H, Tanigawa T, Watanabe T, Taguchi YH, Fujiwara Y. Expression of serum exosomal and esophageal microRNA in rat reflux esophagitis. *Int J Mol Sci*. 2017 Jul 25;18(8). pii: E1611、査読有。
2. 藤原靖弘. GERD 疫学-最近の動向. *日本消化器病学会誌* 2017;114:1781-1789、査読有。
3. Otani K, Tanigawa T, Watanabe T, Shimada S, Nadatani Y, Nagami Y, Tanaka F, Kamata N, Yamagami H, Shiba M, Tominaga K, Fujiwara Y, Arakawa T. Microbiota plays a key role in non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage. *Digestion*. 2017;95(1):22-28、査読有。
4. Nadatani Y, Huo X, Zhang X, Yu C, Cheng E, Zhang Q, Dunbar KB, Theiss A, Pham TH, Wang DH, Watanabe T, Fujiwara Y, Arakawa T, Spechler SJ, Souza RF. NOD-Like receptor protein 3 inflammasome priming and activation in Barrett's epithelial Cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2016 ;2(4):439-453、査読有。
5. Sawada A, Fujiwara Y, Nagami Y, Tanaka F, Yamagami H, Tanigawa T, Shiba M, Tominaga K, Watanabe T, Gi M, Wanibuchi H, Arakawa T. Alteration of

esophageal microbiome by antibiotic treatment does not affect incidence of rat esophageal adenocarcinoma. Dig Dis Sci. 2016;61(11):3161-3168、査読有。

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 沢田明也、藤原靖弘、魏民、鰐淵英機、荒川哲男. ラットモデルを用いた食道腺癌発癌におけるマイクロバイオータの意義. 第 74 回日本癌学会学術集会 2015.10 名古屋

〔図書〕(計 2 件)

1. 藤原靖弘. 胃食道逆流症. 朝倉内科学 P898-901、2017、総ページ数 2534 頁、朝倉書店
2. 藤原靖弘. 機能性消化管疾患ガイドライン 2014 - 過敏性腸症候群. 今日の治療指針 2017、1839-1842、総ページ数 1999 頁、医学書院

〔その他〕

ホームページ等

<https://ocu-gastro.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 靖弘 (FUJIWARA, Yasuhiro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号： 40285292

(2) 研究分担者

富永 和作 (TOMINAGA, Kazunari)

大阪医科大学・医学部・特別任命教員教授

研究者番号： 80336768

渡邊 俊雄 (WATANABE, Toshio)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号： 50336773

谷川 徹也 (TANIGAWA, Tetsuya)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号： 70423879

(4) 研究協力者

沢田 明也 (SAWADA, Akinari)

大阪市立大学・大学院医学研究科・後期臨床

研究医