

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19354

研究課題名(和文)大腸発癌に対する腸内細菌とその代謝物の影響

研究課題名(英文)Influence of gut microbota and metabolite on colon carcinogenesis

研究代表者

内山 詩織 (UCHIYAMA, shiori)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：10714800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、悪性腫瘍と腸内細菌の関連が多く研究されており、疫学研究から *Fusobacterium nucleatum* (Fn) と大腸癌との関連性が報告されている。本研究ではFnと大腸癌の関連に加え、Fnは口腔内にも存在することに注目し、感染経路についても検討した。大腸癌患者の癌部および唾液から検体を採取し、Fnの存在率や口腔内のFnとの関連性を検討した。大腸癌部と口腔内で同一のFn株を持つ症例を認め、口腔内のFnが大腸発癌に影響している可能性が示唆された。大腸癌の早期発見を目的とした口腔内Fnの測定や、口腔内ケアなどによるFnの感染制御による大腸癌の一次予防など今後臨床での応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, many studies about association with malignant tumor and gut microbiota are reported. Furthermore, some studies have reported a high abundance of *Fusobacterium nucleatum* (Fn) in Colorectal cancer (CRC) compared to normal subjects. We paid attention to Fn existing in the oral cavity and investigated the relationship of Fn and CRC and route of infection. We sampled a specimen from cancer lesion of the colon cancer patient and saliva and examined existence rate of Fn and association with Fn in oral cavity and in CRC. The results support a link between the abundance of *Fusobacterium* in oral cavity and CRC, and the possibility that Fn in oral cavity influenced colon carcinogenesis was suggested. The future clinical application such as the measurement of Fn in oral cavity for the purpose of the early detection of colon cancer and primary prevention of colon cancer by the infection control of Fn by oral care is expected.

研究分野：医学、消化器内科、下部消化管、大腸発癌

キーワード：大腸癌 腸内細菌 *Fusobacterium*

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は近年世界的に増加し、わが国ではこの25年間で罹患数が4倍に増えており、2015年のがん統計予測でついにがん罹患数第一位となった。内視鏡検査や健診などの普及により早期発見も増えているが、原因やリスクについての研究が急務である。

一方、免疫や肥満、さらには悪性腫瘍と腸内細菌の関連が近年多く研究されてきており、国民の関心も非常に高い。FISH、定量的PCR法、16S rRNA 配列などをターゲットにした様々なプローブやプライマーによって、多種に及ぶヒト腸内細菌が迅速かつ特異的に検出可能となり、腸内細菌プロファイルが解明されてきたことにより様々な疾患との関連性が明らかになりつつある。大腸癌との関連性についても研究が進んできており、腸内細菌の中でも、臨床の疫学研究から *Fusobacterium nucleatum* (以下 *F. nucleatum*) 感染による大腸上皮の炎症と大腸癌との関連性が報告されているが、メカニズムなどまだ不明な点が多い。*Fusobacterium* 属は紡錘状のグラム陰性偏性嫌気性桿菌で、口腔、気道、消化管に常在している。*Fusobacterium* 属には7つの種が存在しており、特に *F. nucleatum* は歯周病菌のひとつとしても知られている。

本研究は腸内細菌の関わる大腸発癌のメカニズムを明らかにすることにより、発癌予防や早期発見への足がかりとすることを目的とした。

2. 研究の目的

大腸における腸内細菌についての研究は以前よりなされてきたが、長年糞便の培養法により腸内細菌叢の解析を行うという手法がとられてきた。しかし、近年16S rRNA 配列をターゲットにしたプローブやプライマーなどによって、多種に及ぶヒト腸内細菌が迅速かつ特異的に検出可能となり腸内細菌の研究は飛躍的に進歩している。今回我々は、

大腸癌患者や健常人の正常粘膜の菌叢解析を行うことにより、大腸癌患者において腸内細菌がどのような動態を示しているのかを検討した。

さらに、腸内細菌は種々の代謝産物を分泌しており、宿主に様々な影響を与えていることが予想される。腸内細菌は食餌中の栄養素を分解して様々な代謝物を分泌していることが知られており、この代謝物は細菌のエネルギーとなる他にも宿主に様々な影響を与える。報告では、マウスの大腸では *Lactobacillus murinus* とその代謝物である乳酸が大腸上皮細胞増殖を促すと報告している。その他にも酪酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸と大腸癌との関連が研究されている。我々は大腸癌患者の癌部および健常部から組織採取を行い、メタボローム解析することで腸内細菌の代謝物を検索する。大腸発癌の腸内細菌の関与、また原因となる代謝物が明らかになることにより発癌予防や早期発見への足がかりとなることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 41例の大腸癌患者の癌部および非癌部、および健常人の正常大腸粘膜から検体を採取した。組織からDNAを抽出しサンプル中の細菌16rRNAのV3領域をフュージョンプライマーを用いてPCR増幅し、次世代シーケンズを行った。その後シーケンズデータを解析し、癌組織と正常組織の菌叢の相対存在率を比較した。

(2) (1)にて既報と同様にヒト大腸癌検体で *Fusobacterium* 属は癌部で多く認めることが確認できた。さらに感染経路を明らかにするために、15例の大腸癌患者を対象として唾液および癌部から検体を採取し、分離培養を行った。*F. nucleatum* に特異的なプライマーを用いて *F. nucleatum* の有無を評価した後、*F. nucleatum* が大腸癌と唾液から共に検出された症例についてはさらに AP-PCR

(arbitrarily primed-PCR)法を行い、株レベルで共通するものがあるかを評価した。また、唾液、大腸腺腫、大腸癌の検体について定量PCRを行い、*F.nucleatum* の検出率を比較した。

4. 研究成果

(1)

図1は一部の大腸癌患者の菌叢解析を元で作成した系統別の相対存在率のグラフである。

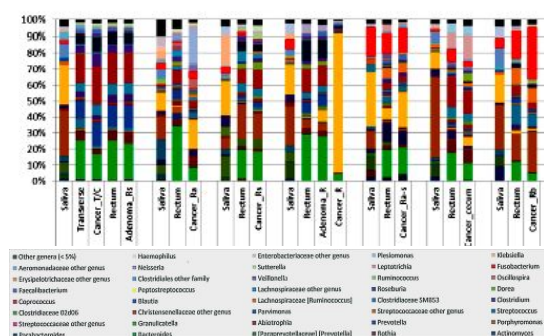


図1

大腸癌患者の癌部と非癌部での相対存在率に差を認める属を検討したところ、*Fusobacterium* 属は癌部で多く、*Bacteroides* 属は健常部で有意に多く認められた。(図3)

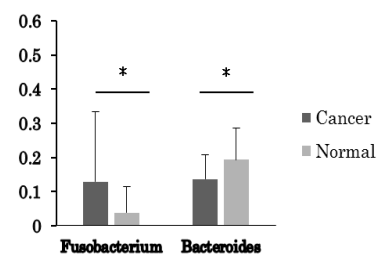


図3

(2) 15名のうち、1名は培養ができず除外とした。残りの14名のうち、大腸癌は8名で検出した。また、唾液は14名全員から検出した。大腸癌、唾液で共に *F.nucleatum* が検出された8例についてはAP-PCRにより合計で1351株を認め、75%の症例で株の一致を認めた。また、定量PCRでは唾液で92%、大腸正常粘膜で4%、大腸腺腫で12%、大腸癌で34%に *F.nucleatum* を検出した。特に進行大腸癌に限れば81%で *Fn* を検出した。

大腸癌患者において、大腸癌と口腔内で同一の *F.nucleatum* 株を持つ症例があるため、口腔内の *F.nucleatum* が何らかの経路により大腸癌に及んでいる可能性が示唆された。大腸癌の早期発見を目的とした口腔内 *F.nucleatum* の測定や、口腔内ケアを主とした *F.nucleatum* の感染制御による大腸癌の一次予防など今後臨床での応用が期待される。

今後は、大腸癌組織検体に加え、大腸上皮粘膜層を採取し、大腸上皮粘膜層をキャピラリー電気泳動と飛行時間型質量分析装置を組み合わせたメタボローム解析を行う予定としている。腸内細菌と関連する代謝産物を網羅的に検索し解析することにより、大腸発癌の原因を探る。

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)

[学会発表](計3件)

Correlation of *Fusobacterium nucleatum* in oral cavity and colorectal cancer 第103回 日本消化器病学会総会 ワークショップ5 小宮靖彦, 日暮琢磨, 中島淳 2017

Correlation of *Fusobacterium nucleatum* in oral cavity and colorectal cancer JDDW (Japan Digestive Disease Week) 小宮靖彦, 日暮琢磨, 中島淳 2017

Association of *Fusobacterium nucleatum* in oral cavity and colorectal carcinomas UEG (United European Gastroenterology) 小宮靖彦, 日暮琢磨, 中島淳 2017

[図書](計1件)

【腸内細菌をめぐって】発癌と腸内細菌大腸癌と口腔内細菌 小宮靖彦, 日暮琢磨, 中

6 . 研究組織

(1)研究代表者

内山詩織 (UCHIYAMA, Shiori)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号 : 10714800

(4)研究協力者

小宮靖彦 (KOMIYA, Yasuhiko)

日暮琢磨 (HIGURASHI, Takuma)

中島淳 (NAKAJIMA, Atsushi)