

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04273

研究課題名(和文) 食道癌の新規治療法開発を目指したmicrobiomeとエピジェネティクス解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of gut microbiome and epigenetic changes in esophageal cancer.

研究代表者

馬場 祥史 (Baba, Yoshifumi)

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：20599708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：Fusobacteriumは主に口腔内に生息するmicrobiomeの一種で、一般的には歯周病の原因菌として知られている。これまで、Fusobacterium nucleatumが食道癌の進展・浸潤に関与していることを報告してきたが、今回、Fuso 陽性症例はLINE-1メチル化レベル(ゲノム全体のメチル化レベル)が有意に低いことを世界で初めて明らかにした。次に、消化器癌300例以上を解析し、LINE-1低メチル化症例では有意にLINE-1増幅が起っていることを示した。また、LINE-1低メチル化食道癌症例では腫瘍免疫が抑制されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌叢microbiomeは薬剤などにより後天的に変化させうるものであり、疾患治療のターゲットとしてもきわめて有望である。よって、“Fusobacteriumという口腔内に存在する菌が、食道癌のメチル化や腫瘍免疫に関与する”という今回得られた結果は臨床応用に直結する可能性があり、創薬へ向けた橋渡し研究として極めて意義深いものである。

研究成果の概要(英文)：Fusobacterium nucleatum (F. nucleatum), which primarily inhabits the oral cavity, causes periodontal disease. F. nucleatum influences the development and progression of esophageal cancer. First, we showed that F. nucleatum tumors had lower LINE-1 methylation level (global DNA methylation). Second, we could demonstrate that LINE-1 hypomethylation was associated with LINE-1 copy number in esophageal cancers. Third, we found that tumor LINE-1 hypomethylation level was associated with a diminished peritumoral lymphocytic reaction.

研究分野：外科腫瘍学、腫瘍免疫学

キーワード：腸内細菌叢 LINE-1 食道癌 腫瘍免疫 Fusobacterium

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌におけるエピジェネティックな異常には、DNAメチル化の異常、ヒストン修飾の異常、ゲノムインプリンティングの異常などがあげられる。癌におけるDNAメチル化異常の特徴として、ゲノム全体の低メチル化と、ある特定の遺伝子プロモーターのCpG islandにおける部分的な高メチル化がある。LINE-1はゲノム全体の約17%を占める転位因子であり、そのメチル化レベルはゲノム全体のメチル化レベルの指標となりうる (Baba Y et al. Mol Cancer 2010, Baba Y et al. Cancer Lett 2016)。我々は、200例以上の食道癌組織のLINE-1メチル化レベルをPyrosequenceにより測定し、低メチル化症例は予後不良であることを明らかにしてきた (Iwagami S, Baba Y et al. Ann Surg 2012)。また、LINE-1低メチル化症例ではゲノムDNAの欠失、増幅などのコピー数異常を高頻度に認め、CDK6などに代表される癌関連遺伝子の増幅により癌の悪性度に寄与していた (Baba Y et al. Clin Cancer Res 2014)。また、ユビキチンリガーゼであるUHRF1がゲノム全体のメチル化レベルを制御していることをin vitroの実験系で証明した (Nakamura K, Baba Y et al. Oncotarget 2016)。

Microbiomeとは人体に生存する微生物群とその遺伝子および代謝活性の総称である。Microbiomeは、近年、癌、肥満、炎症性腸疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患など様々な疾患との関連が報告され、注目を集めている先端性の高い分野である。多くの環境因子、遺伝的因子、エピジェネティックな因子によって調節・変更され、その人の特有な細菌状態が形成される。Microbiomeの多様性は、体の部位、個人間、年齢、食事などによっても変化し、また時間的にも変化する。Fusobacteriumは主に口腔内に生息するmicrobiomeの一種で、歯周病の原因菌として知られているが、大腸癌の発癌・浸潤へ関与することが示されていた。我々は、食道癌325症例のFusobacterium nucleatum (F. nucleatum) のDNA量を定量リアルタイムPCR法にて測定し、F. nucleatum陽性症例が有意に予後不良であることを明らかにした。 (Yamamura K, Baba Y et al. Clin Cancer Res 2016)。このことから、食道癌の発癌・浸潤過程においても、microbiomeが重要な働きをしていることを実証された。

我々は、Microbiome (腸内細菌叢) が食道癌のエピゲノム (特にLINE-1メチル化レベル) に影響を及ぼし、癌の悪性度に寄与するという仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

500例以上の食道癌データバンクを用いて、食道癌におけるMicrobiome (ヒト微生物叢) とエピジェネティック変化 (LINE-1ゲノム全体のメチル化) の関連を網羅的に解析し、革新的なbiomarkerを開発することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

食道癌サンプルを16S rRNAシーケンスにより解析し、microbiomeを網羅的に評価する計画であったが、最初に、これまで研究を行ってきたFusobacterium nucleatumとLINE-1メチル化レベルの関係を評価することとした。

### 4. 研究成果

食道癌データベースを用いて、Fusobacterium nucleatumとLINE-1メチル化レベルの関係を評価したところ、Fusobacterium陽性症例では有意にLINE-1メチル化レベルが低いことが分かった (図1)。このことから、Fusobacterium nucleatumが食道癌のLINE-1メチル化レベルに影響を及ぼし、癌の悪性度に寄与することが示唆された。

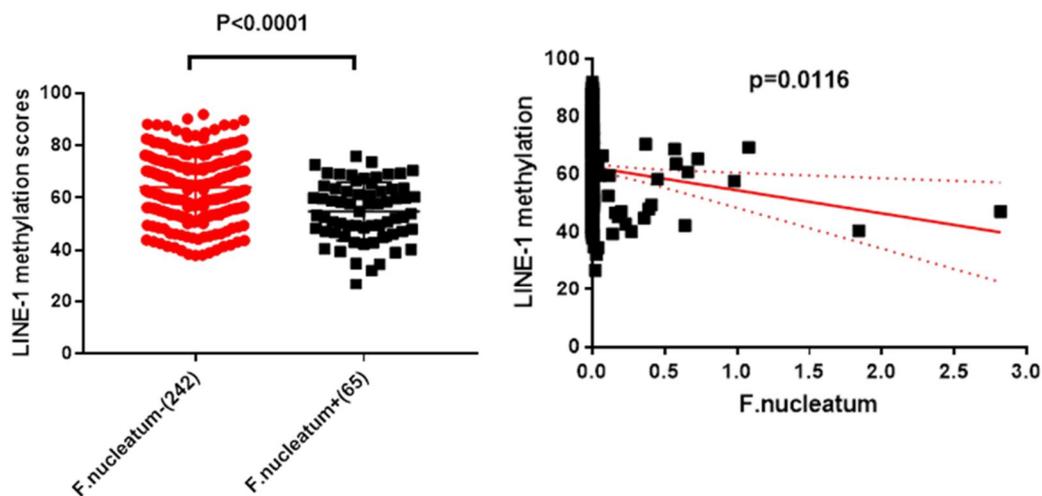


図1: FusobacteriumとLINE-1メチル化の関係

次に、食道癌細胞株 TE8 と *Fusobacterium nucleatum* を共培養して、LINE-1 メチル化レベルが変化するかを *in vitro* で検証した。若干 LINE-1 メチル化レベルは低下したが有意な変化は認められなかった (図 2)。In vitro での検証は難しいと判断し、LINE-1 メチル化と LINE-1 増幅の関係を証明していくこととした。

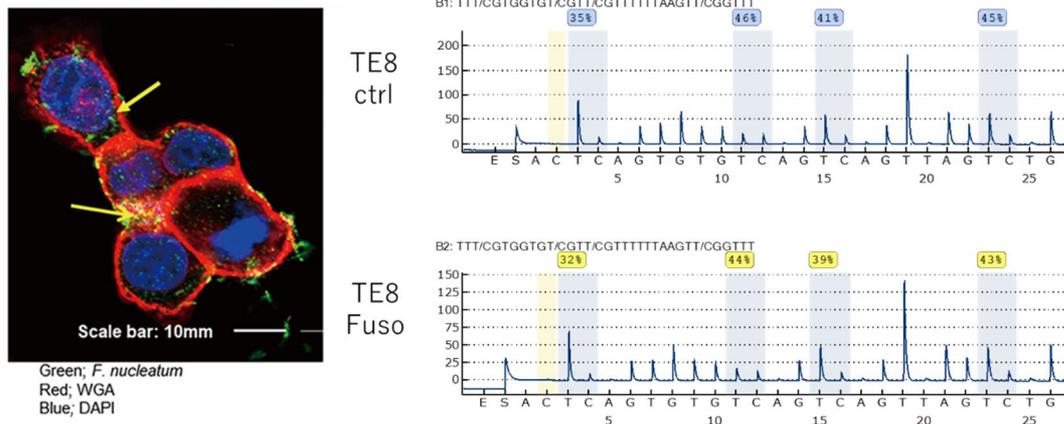


図 2 : *Fusobacterium* と食道癌細胞株の共培養による LINE-1 メチル化の変化

食道癌患者術後検体の癌部及び非癌部ペアのサンプルより DNA を抽出し、LINE-1 ORF2 をターゲットとした LINE-1 増幅解析 qPCR を行った (LINE-1 は ORF2 側よりゲノムへ新規挿入されるため)。癌部及び非癌部ペアで qPCR の結果を比較することにより、LINE-1 の新規挿入が癌部で多く起こっていることが明らかになった (図 3)。

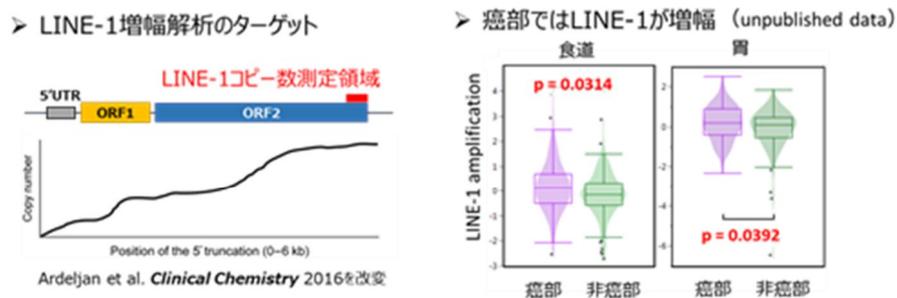


図 3 : LINE-1 メチル化レベルと LINE-1 増幅の関係

腸内細菌が腫瘍免疫に影響を与えて癌の悪性度獲得に寄与するというデータが近年いくつかの研究グループから報告されていることをうけて、*Fusobacterium nucleatum* LINE-1 メチル化腫瘍免疫という関係を明らかにしたいと考えた。そこで、まず *Fusobacterium nucleatum* と腫瘍免疫の関係を検証することとした。腫瘍中のリンパ球浸潤を HE 標本で評価し、腫瘍免疫 High, intermediate, low と分類した。すると、*Fusobacterium* が多い症例では腫瘍免疫が抑制されていることが分かった。次に、CD3 の免疫染色を行い、CD3 腫瘍浸潤リンパ球について検証した。そうすると、*Fusobacterium* 陽性症例では CD3 リンパ球が有意に少ないことが明らかになった (図 4)。このことから、*Fusobacterium* は腫瘍免疫の抑制などのメカニズムにより癌の悪性度に関与していることが示唆された。

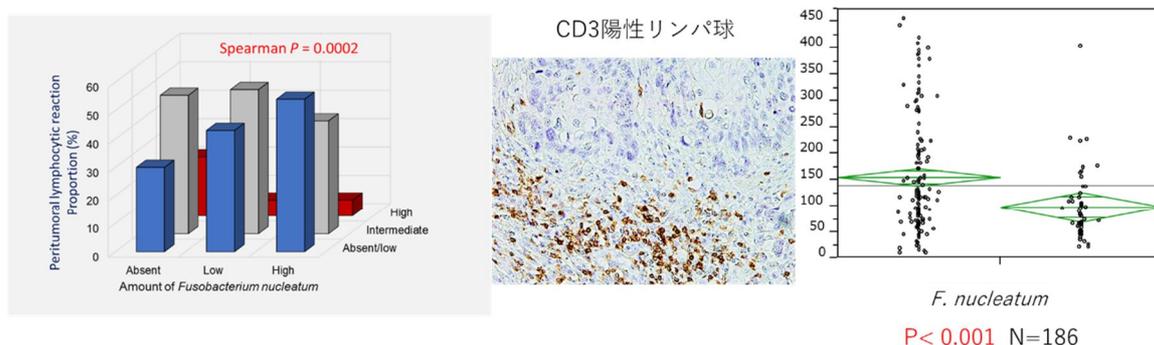


図 4 : *Fusobacterium* と腫瘍免疫の関係

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Baba Y., Yagi T., Kosumi K., Okadome K., Nomoto D., Eto K., Hiyoshi Y., Nagai Y., Ishimoto T., Iwatsuki M., Iwagami S., Miyamoto Y., Yoshida N., Komohara Y., Watanabe M., Baba H.	4. 巻 106
2. 論文標題 Morphological lymphocytic reaction, patient prognosis and PD-1 expression after surgical resection for oesophageal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BJS	6. 最初と最後の頁 1352 ~ 1361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bjs.11301	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kosumi Keisuke, Baba Yoshifumi, Okadome Kazuo, Yagi Taisuke, Kiyozumi Yuki, Yoshida Naoya, Watanabe Masayuki, Baba Hideo	4. 巻
2. 論文標題 Tumor Long-interspersed Nucleotide Element-1 Methylation Level and Immune Response to Esophageal Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.00000000000003264	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yagi Taisuke, Baba Yoshifumi, Okadome Kazuo, Kiyozumi Yuki, Hiyoshi Yukiharu, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Watanabe Masayuki, Komohara Yoshihiro, Baba Hideo	4. 巻 111
2. 論文標題 Tumour-associated macrophages are associated with poor prognosis and programmed death ligand 1 expression in oesophageal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 38 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejca.2019.01.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamura Kensuke, Izumi Daisuke, Kandimalla Raju, Sonohara Fuminori, Baba Yoshifumi, Yoshida Naoya, Kodera Yasuhiro, Baba Hideo, Goel Ajay	4. 巻 25
2. 論文標題 Intratumoral Fusobacterium Nucleatum Levels Predict Therapeutic Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6170 ~ 6179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-19-0318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mina Kosuke, Sakamoto Yuki, Kosumi Keisuke, Ogata Yoko, Miyake Keisuke, Hiyoshi Yukiharu, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Baba Yoshifumi, Iwagami Shiro, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Ogino Shuji, Baba Hideo	4. 巻 32
2. 論文標題 Mucosal cancer-associated microbes and anastomotic leakage after resection of colorectal carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 63 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.suronc.2019.11.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kalikawe Rebecca, Baba Yoshifumi, Nomoto Daichi, Okadome Kazuo, Miyake Keisuke, Eto Kojiro, Hiyoshi Yukiharu, Nagai Youhei, Iwatsuki Masaaki, Ishimoto Takatsugu, Iwagami Shiro, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Watanabe Masayuki, Baba Hideo	4. 巻 110
2. 論文標題 Lysyl oxidase impacts disease outcomes and correlates with global DNA hypomethylation in esophageal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3727 ~ 3737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14214	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Haruki K, Kosumi K, Hamada T, Baba Y, Ogino S et al.	4. 巻 250
2. 論文標題 Association of autophagy status with amount of Fusobacterium nucleatum in colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 397 ~ 408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5381	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Okadome Kazuo, Baba Yoshifumi, Nomoto Daichi, Yagi Taisuke, Kalikawe Rebecca, Harada Kazuto, Hiyoshi Yukiharu, Nagai Yohei, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Iwagami Shiro, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Watanabe Masayuki, Komohara Yoshihiro, Shono Takashi, Sasaki Yutaka, Baba Hideo	4. 巻 122(10)
2. 論文標題 Prognostic and clinical impact of PD-L2 and PD-L1 expression in a cohort of 437 oesophageal cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1535-1543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-0811-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okadome Kazuo, Baba Yoshifumi, Yagi Taisuke, Kiyozumi Yuki, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Watanabe Masayuki, Baba Hideo	4. 巻 271
2. 論文標題 Prognostic Nutritional Index, Tumor-infiltrating Lymphocytes, and Prognosis in Patients with Esophageal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 693 ~ 700
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000002985	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kiyozumi Yuki, Baba Yoshifumi, Okadome Kazuo, Yagi Taisuke, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Watanabe Masayuki, Komohara Yoshihiro, Baba Hideo	4. 巻 269
2. 論文標題 IDO1 Expression Is Associated With Immune Tolerance and Poor Prognosis in Patients With Surgically Resected Esophageal Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 1101 ~ 1108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000002754	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liu Yang, Baba Yoshifumi, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Hiyoshi Yukiharu, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Wu Rong, Baba Hideo	4. 巻 54
2. 論文標題 Progress in characterizing the linkage between Fusobacterium nucleatum and gastrointestinal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 33 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-018-1512-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yagi Taisuke, Baba Yoshifumi, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Watanabe Masayuki, Baba Hideo	4. 巻 269
2. 論文標題 PD-L1 Expression, Tumor-infiltrating Lymphocytes, and Clinical Outcome in Patients With Surgically Resected Esophageal Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 471 ~ 478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000002616	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小澄敬祐、馬場祥史、山村謙介、岡留一雄、八木泰佑、清住雄希、岩槻政晃、長井洋平、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 食道癌コホートをを用いたFusobacterium nucleatumと腫瘍免疫の統合解析
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野元大地、馬場祥史、秋山貴彦、岡留一雄、山下晃平、坂本悠樹、大徳暢哉、織田枝里、内原智幸、徳永竜馬、原田和人、山村謙介、江藤弘二郎、日吉幸晴、長井洋平、岩槻政晃、石本崇胤、岩上志朗、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 Fusobacterium nucleatumの食道癌進展への関与とそのメカニズム；腫瘍免疫、NF- $\kappa$ B経路との関連
3. 学会等名 第30回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場祥史、岡留一雄、八木泰佑、黒田大介、澤山浩、日吉幸晴、岩槻政晃、石本崇胤、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 個別化治療を目指したLINE-1メチル化レベル解析：予後予測、早期診断、免疫チェックポイント阻害剤のbiomarkerとしての可能性
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshifumi Baba, Keisuke Kosumi, Daichi Nomoto, Kazuo Okadome, Taisuke Yagi, Yuki Kiyozumi, Kojiro Eto, Yukiharu Hiyoshi, Takatsugu Ishimoto, Masaaki Iwatsuki, Shiro Iwagami, Yuji Miyamoto, Naoya Yoshida, Hideo Baba
2. 発表標題 LINE-1 methylation level and local immune response in esophageal cancer
3. 学会等名 The International Society for Disease of the Esophagus (ISDE) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬場祥史、小澄敬祐、岡留一雄、八木泰佑、清住雄希、江藤弘二郎、日吉幸晴、長井洋平、石本崇胤、岩上志朗、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 食道癌におけるLINE-1メチル化と腫瘍免疫
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬場祥史、山村謙介、江藤弘二郎、日吉幸晴、長井洋平、岩槻政晃、岩上志朗、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 腸内細菌 <i>Fusobacterium nucleatum</i> は食道癌に対する化学療法感受性に影響を与える
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Liu Yang, Yoshifumi Baba, Shigeki Nakagawa, Hiroshi Sawayama, Takatsugu Ishimoto, Masaaki Iwatsuki, Yuji Miyamoto, Yoichi Yamashita, Naoya Yoshida, Hideo Baba
2. 発表標題 The relationship between Microbiome <i>Fusobacterium Nucleatum</i> and autophagy in esophageal cancer
3. 学会等名 American Association for Cancer Research 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	美馬 浩介 (Mima Kosuke) (00546559)	熊本大学・病院・非常勤診療医師  (17401)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	澤 智裕 (Sawa Tomohiro)  (30284756)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・教授  (17401)	
研究分担者	吉田 直矢 (Yoshida Naoya)  (60467983)	熊本大学・病院・特任准教授  (17401)	