

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09103

研究課題名（和文）胆嚢がん発症要因としての胆汁中微生物のメタゲノム解析と感染履歴の検証

研究課題名（英文）Metagenomic analysis of bacterial flora in the bile of patients with gallbladder cancer or cholelithiasis and verification of bacterial infection history

研究代表者

土屋 康雄 (Tsuchiya, Yasuo)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60334679

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：感染症と胆嚢がん発症との関係を解明するため、インド胆嚢がん患者と胆石症患者の胆汁中の常在細菌叢をメタゲノム解析で調べた。さらに、チフス菌やヘリコバクター・ピロリ菌感染との関係を明らかにするため血清あるいは血漿抗体価の測定を行った。

胆嚢がん患者の胆汁中にはStreptococcus anginosusグループの菌が特異的に検出され、本症発症との関係が示唆された。チフス菌感染と胆嚢がん発症との関係は示唆されたが、ヘリコバクター・ピロリ菌感染と本症発症との関連は確認できなかった。胆嚢がん患者の胆汁中から特異的に検出された菌と本症発症との関係は、患者数を増やし、他の地域の患者での検証が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、胆嚢がん発生率が高いインド北部の胆嚢がん患者の胆汁中にはStreptococcus anginosusグループの菌が特異的に検出されることを世界に先駆けて明らかにした。

胆嚢がん患者に特異的に検出された菌が本症発症に関係していることを実証するためにはさらに症例数を増やし、別の地域の胆嚢がん患者でも同様の結果が得られるかどうかを確認する必要がある。

両者の関係が確認でき、口腔内から血行性に菌の感染が広がることが分かれば、口腔ケアなど迅速かつ容易な予防策を策定することは可能である。それらを実践することにより、将来のインドにおける胆嚢がん発症率、死亡率の低下に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the association between bacterial infection and developing gallbladder cancer (GBC), we examined the bacterial flora in the bile of patients with Indian GBC and chronic cholelithiasis (CC) using metagenomic analysis. Furthermore, serum or plasma antibody titers were measured to clarify the association between Salmonella typhi and paratyphi or Helicobacter pylori infections and developing GBC.

Streptococcus anginosus group bacteria were specifically detected in the bile of GBC patients, suggesting a relationship with the development of this disease. Although a relationship between Salmonella typhi infection and developing GBC was observed, no association between Helicobacter pylori infection and developing this disease could be confirmed.

Additional studies are needed to verify the association between the bacteria with specifically detected in the bile of GBC patients and developing this disease.

研究分野：環境衛生、予防医学

キーワード：胆嚢がん インド 環境要因 胆汁 細菌 メタゲノム解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

インドの National Cancer Registry Program (NCRP) は、2016 年のインドにおけるがん患者数は 145 万人、がん死亡者数は 74 万人であり、2020 年には患者数が 173 万人、死亡者数が 88 万人に達すると予測した (インド医学研究評議会, ICMR, 2016)。がんのコントロールについては、医師をはじめ多くのヘルスケア関係者がその必要性を認識しているが、有効な対策はまだ講じられていない。

インドは胆嚢がん多発国であり、その発生率には大きな地域差が見られ、北部は南部に比べて本症発生率が高い (ICMR, 2016)。最近の研究で、インドにおける胆嚢がん患者数は 2025 年までに全世界の胆嚢がん患者数の男性で 9.8%、女性で 11.2% を占めることが推定されている (国際がん研究機関, IARC, GLOBOCAN 2012)。このため、インドにおいて胆嚢がんの発生率や死亡率を減少させることは喫緊の課題となっている。インドにおける胆嚢がん発症率を低下させるためには、本症発生に関する環境要因を明らかにし、その対策を実践することが重要であるが、インド北部に特有な環境要因はまだ明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、「胆嚢などの空洞で且つ体液をふくんでいる臓器の腫瘍は、体液中に生息している微生物 (細菌) によって引き起こされる」という仮説をたてて実施するものである。

その目的は、インド胆嚢がん患者と胆石症患者から採取した胆汁中に生息している細菌叢を次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析で調べ、各試料中にどのような細菌がどのくらい存在しているのかを明らかにすること。さらに、チフス菌やヘリコバクター・ピロリ菌感染と本症発生との関係を明らかにするため、胆嚢がん患者と胆石症患者を対象として、チフス菌、パラチフス A 菌及び B 菌、ヘリコバクター・ピロリ菌抗原に対する抗体価を測定し、両群間で比較することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 胆汁中細菌叢のメタゲノム解析

対象者: 2017 年 12 月 ~ 2020 年 12 月までに、インド北部のサンジャイ・カンジー医科大学大学院 (SGPGIMS) で胆嚢がんと診断された患者 32 名と、胆石症と診断された患者 72 名の計 104 名を対象とした。

胆汁採取: 対象者の同意を得て、胆摘後の胆嚢から胆汁を約 1 mL 吸引採取した。採取後の胆汁は滅菌試験管に移し、直ちに - 80 のフリーザー中に保存した。

胆汁からの DNA 抽出: 市販キット (PureLink Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen) を用いて胆汁中から DNA を一括抽出した。

細菌 DNA の確認: 胆汁中細菌 DNA の有無は、細菌のユニバーサルプライマーを使った PCR 法により確認した。用いたプライマーは、フォワード: TCCTACGGGAGGCAGCAGTG、リバーズ: GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT であり、アニーリング温度は 65 で 446 bp のバンドの有無を確認した。

その結果、細菌 DNA の検出率は、胆嚢がん患者で 30 例 (94%)、胆石症患者で 51 例 (71%) であった。このうち、胆嚢がん患者 30 例 (女性 22 名、男性 8 名、平均年齢 55.9 ± 14.0 歳) とランダムに選択した胆石症患者 30 例 (女性 23 名、男性 7 名、平均年齢 40.7 ± 12.4 歳) を対象者とし、各々の胆汁中から検出された細菌 DNA をメタゲノム解析に供した。

胆汁中細菌叢のメタゲノム解析: 細菌 DNA を用い 16S rRNA 領域 (V3 V4 領域) を増幅して PCR 産物を得た。用いたプライマーは次のとおりである。16S Amplicon PCR Forward Primer = 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG、16S Amplicon PCR Reverse Primer = 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC。

次に、PCR 産物を精製してシーケンスライブラリーを作成した。シーケンスデータの精度管理は、FastQC tool v 0.11.7 (Babraham 研究所) を使用して行い、良好な結果を得た。その後、Illumina Miseq を用いて、シーケンス解析塩基長を 300 としたペアエンド法、平均 10 万以上 / 試料のリードで塩基配列を取得した。得られた配列は、メタゲノム解析ツール (QIIME2) を用いてデータベース (Green gene Database) と照合し、対象試料中にどのような細菌がどのくらい存在しているかを明らかにした。

統計解析: 胆嚢がん患者と胆石症患者の胆汁中から得られた菌種を比較した。マン・ホイットニーの U 検定を用いて両群間のアルファ多様性の評価を行った。また、一方の患者群で 5 例以上の患者から検出され、他方の患者群で検出されなかった菌をそれぞれ「特異的に検出された菌」とみなした。

#### (2) チフス、パラチフス菌抗原に対する血清抗体価測定

対象者: 2017 年 4 月から 2019 年 4 月まで SGPGIMS の消化器外科で胆嚢がんと診断された 100 名の患者 (平均年齢、52.3 ± 12.3 歳)、24 名の黄色肉芽腫性胆嚢炎患者 (平均年齢、54.4 ± 11.1 歳)、200 名の胆石症患者 (平均年齢、44.9 ± 13.4 歳) と 200 名の健常者 (献血者、平均

年齢、32.2±9.1歳)を対象者とした。

試料及び方法:胆嚢がん患者と胆石症患者から採取した血清を試料とした。チフス菌抗原(Vi、O)とパラチフスA菌とB菌のO抗原に対する血清抗体価は、U字型96ウェルマイクロプレートと市販のウィダール反応用抗原(デンカ生研株式会社)を使用して分析した。凝集価成績の判定は、チフス菌O抗原が1:160以上、Vi抗原が1:20以上、パラチフスA菌が1:80以上、パラチフスB菌が1:160以上をそれぞれ陽性と判定した(増田ら、2018)。

### (3) 血漿ヘリコバクター・ピロリ感染陽性率

対象者:2014年5月~2017年7月まで、SGPGIMSで胆嚢がんと診断された患者100名(男性28名、女性72名、平均年齢、53.0±11.2歳)と100名の胆石症患者(男性35名、女性65名、平均年齢、44.9±13.5歳)を対象とした。

試料及び方法:胆嚢がん患者と胆石症患者から採取した血漿を試料とした。血漿ヘリコバクター・ピロリ抗体価は、市販のキット(LZ Eiken H. pylori抗体、栄研化学)および自動分析装置(BM 9130、日本電子)を使用して測定した。ヘリコバクター・ピロリ感染は、キットのマニュアルに従って、血漿抗体価が10 U / mL以上の場合感染陽性とした。両群間の感染陽性率の差は、双方向分割表分析を使用してオッズ比(OR)と95%信頼区間(CI)を計算し、P値0.05未満を有意差ありとした。

## 4. 研究成果

### (1) 胆汁中細菌叢のメタゲノム解析

アルファ多様性評価の結果:胆嚢がん患者と胆石症患者の胆汁中から検出された菌種数は胆嚢がん患者では中央値327、四分位範囲180~434、胆石症患者では、中央値265、四分位範囲196~357であったが、両群間には有意差は認められなかった(P=0.237)。さらに、群集構造のアルファ多様性分析(中央値、四分位範囲)を行い、Chao1 index(胆嚢がん患者、446、248~578、胆石症患者、373、254~465、P=0.225)とShannon index(胆嚢がん患者、3、2~4、胆石症患者3、2~4、P=0.179)には両群間の有意差は認められなかったが、Simpson indexは、胆嚢がん患者(0.77、0.60~0.86)、胆石症患者(0.65、0.49~0.77)であり胆嚢がん患者の方が有意に高い値を示した(P=0.021)。このことから、胆嚢がん患者の方が胆石症患者に比べ検出された菌種数が多く、多様性のレベルも高いことが示された。

メタゲノム解析結果:胆嚢がん患者30例の胆汁中からは691種、胆石症患者30例の胆汁中から530種の菌が検出された。表1に胆嚢がん患者と胆石症患者の胆汁中から特異的に検出された菌種を示す。

表1

検出された菌種	検出患者数(%)
胆嚢がん患者に特異的に検出された菌種	
<i>Streptococcus anginosus</i>	20 (67)
<i>Limnobacter thiooxidans</i> strain CS-K2	12 (40)
<i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i> strain CCUG 39159	9 (30)
<i>Actinomyces bowdenii</i> strain M1327/96/1	8 (27)
<i>Dialister invisus</i> strain JCM 17566	8 (27)
<i>Scardovia wiggsiae</i> strain C1A_55	8 (27)
<i>Streptococcus mutans</i> strain NBRC 13955	8 (27)
<i>Sulfurimonas gotlandica</i> strain GD1	8 (27)
<i>Actinomyces israelii</i> strain JCM 12964	7 (23)
<i>Alkaliphilus peptidifermentans</i> strain Z-7036	7 (23)
<i>Streptococcus constellatus</i> subsp. <i>pharyngis</i> SK1060 = CCUG 46377	7 (23)
<i>Actinomyces gerencseriae</i> strain 2-606-032	6 (20)
<i>Streptococcus intermedius</i> strain 1877	6 (20)
<i>Olsenella profusa</i> DSM 13989	5 (17)
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845	5 (17)
胆石症患者に特異的に検出された菌種	
<i>Pseudomonas punonensis</i> strain LMT03	22 (73)
<i>Pseudomonas fluvialis</i> strain ASS-1	7 (23)
<i>Tuberibacillus calidus</i> strain 607	6 (20)
<i>Aeribacillus composti</i> strain N.8	5 (17)
<i>Laceyella sediminis</i> strain RHA1	5 (17)

胆嚢がん患者の胆汁中から15種、胆石症患者の胆汁中から5種の菌種が特異的に検出された。このうち、胆嚢がん患者の胆汁中からは、*Streptococcus (S.) anginosus* グループ(SAG)のS.

*anginosus* が 67% (20 / 30 例) の高い割合で検出されることを世界で最初に明らかにした。この他、*S. anginosus* の亜種や SAG の *S. constellatus* と *S. intermedius* の 2 菌種も同時に検出された。これら以外の菌には口腔内分離菌 (*S. mutans* strain NBRC 13955、*Actinomyces israelii* strain JCM 12964) や嫌気性菌 (*Dialister invisus* strain JCM 17566、*Sulfurimonas gotlandica* strain GD1、*Alkaliphilus peptidifermentans* strain Z-7036)、及び両者の菌 (*Scardovia wiggisiae* strain C1A-55、*Olsenella profusa* DSM 13989、*Prevotella melaninogenica* ATCC 25845) が含まれていた。

SAG は、口腔、泌尿生殖器、消化管などの粘膜の常在菌で、口腔内細菌叢の一部を形成する菌群である。これらの菌は、弱毒性菌と考えられており、口腔内や女性生殖器などにおいて宿主と共存しているが、宿主の抵抗力が低下した際に、何らかの原因で体内に侵入すると、日和見的に様々な感染症を引き起こすことが古くから知られている (Sasaki et al. 1998)。近年、SAG は日和見的に口腔内や深部臓器において化膿性疾患を引き起こし、食道がん (Narikiyo et al. 2004)、口腔がん (Sasaki et al. 2005)、化膿性肝膿瘍 (重福ら. 2014)、脳膿瘍 (Kragha, 2016)、結腸直腸がん (Masood et al. 2016) などの発症との関係が報告されている。また、嫌気性菌との混合感染で膿瘍形成傾向の増強が報告されている (新里, 1994)。

これまで、SAG およびその DNA が胆嚢がん患者の胆汁中から特異的に検出されたという研究は応募者が調べた限りにおいてなかった。SAG が膿瘍を形成する機序はまだ十分に解明されていないが、胆嚢がん患者の胆汁中から SAG が特異的に検出された事実は、SAG が胆嚢がん発症と関連している可能性を示唆している。我々が検討した例数は各 30 例の胆嚢がん患者と胆石症患者であった。両者の関係を証明するためには症例数を増やし、さらに他の地域でも同様の結果が得られるかどうかを検証する必要がある。

一方、胆石症患者の胆汁中から検出された 5 種の菌は、すべて非病原性と考えられる菌であった。

## (2) チフス、パラチフス菌抗原に対する血清抗体価

チフス菌、パラチフス菌感染は、胆嚢がん患者 (22%) および黄色肉芽腫性胆嚢炎患者 (29%) で高く、特に 50 歳以上の男性 (胆嚢がん患者: 47% および黄色肉芽腫性胆嚢炎患者: 50%) では、健常者 (0) に比べ有意に高い陽性率を示した ( $p < 0.01$ )。チフス菌 Vi 抗体は、健常者 (2%) よりも胆嚢がん患者 (13%、OR : 9.8) および黄色肉芽腫性胆嚢炎患者 (8%、OR : 5.9) でより高い陽性率を示した。チフス菌 O 抗体は、健常者 (1%) よりも胆嚢がん患者 (8%、OR : 8.6) および黄色肉芽腫性胆嚢炎患者 (8%、OR : 9.0) でより高い陽性率を示し、胆石症患者 (1%) および健常者 (1%) よりも胆嚢がん患者 (12%) の男性でより高い陽性率を示した (それぞれ  $P=0.02$  および  $p < 0.001$ )。パラチフス A 菌の O 抗体 (6%) および B 菌 O (4%) 抗体陽性は、健常者 (0) よりも胆嚢がん患者、特に男性で高く検出されました ( $p < 0.01$ )。さらに、サルモネラ抗体は、胆石のない胆嚢がん患者よりも胆石のある胆嚢がん患者でより高い陽性率を示した (50% 対 20%、OR = 3.94、 $P=0.01$ )。

本研究により、サルモネラ菌の感染歴は、健常者に比べ高齢男性の胆嚢がん患者と黄色肉芽腫性胆嚢炎患者で有意に高いことが明らかとなった。チフス菌 Vi 抗体価は、健常者よりも胆嚢がん患者と黄色肉芽腫性胆嚢炎患者でより高いことが明らかとなった。さらに、サルモネラ感染の割合は、胆石のない胆嚢がん患者より胆石を有する胆嚢がん患者の方がより高いことが分かった。

## (3) 血漿ヘリコバクター・ピロリ感染陽性率

平均ヘリコバクター・ピロリ抗体価 (標準偏差、範囲) は、胆嚢がん患者では 11.1 U / mL (11.6、0-78)、胆石症患者では 13.6 U / mL (23.0、1-164) であった。ヘリコバクター・ピロリ感染陽性率は、胆嚢がん患者で 41%、胆石症患者で 42% であった。両群間にはヘリコバクター・ピロリ抗体価またはその感染陽性率に有意差は認められなかった。男女別による胆嚢がん患者と胆石症患者の間の平均抗体価 (標準偏差) は、男性: 12.1 U / mL (9.2) 対 9.4 U / mL (7.4)、女性: 10.7 U / mL (12.5) 対 15.9 U / mL (27.8) であり、両群間には有意差は認められなかった (男性、 $P = 0.15$ 、女性  $P = 0.21$ )。さらに、年齢階級別による平均抗体価を比較した結果、胆嚢がん患者、胆石症患者いずれの群においても有意差は観察されず、年齢が高くなるにつれて抗体価の上昇は認められなかった。

我々の知見は、ヘリコバクター・ピロリ感染がインド人の胆嚢がんリスクの増加とは関係がないことを示している。我々の調査結果はさらなる確認を必要とするが、ヘリコバクター・ピロリ菌感染がインド人の胆嚢がんの重要な危険因子ではないという証拠を提供するものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takao Asai, Yasuo Tsuchiya, Kumudesh Mishra, Anu Behari, Pooja Shukla, Toshikazu Ikoma, Vinay K Kapoor, Kazutoshi Nakamura.	4. 巻 20
2. 論文標題 Carcinogen Metabolism Pathway and Tumor Suppressor Gene Polymorphisms and Gallbladder Cancer Risk in North Indians: A Hospital-Based Case-Control Study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Asian Pac J Cancer Prev	6. 最初と最後の頁 3643-3647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.31557/APJCP.2019.20.12.3643.	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 Tsuchiya Y, Mishra K, Kapoor VK, Vishwakarma R, Behari A, Ikoma T, Asai T, Endoh K, Nakamura K.	4. 巻 19
2. 論文標題 Plasma Helicobacter pylori antibody titers and Helicobacter pylori infection positivity rates in patients with gallbladder cancer or cholelithiasis: a hospital-based case-control study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Asian Pac J Cancer Prev	6. 最初と最後の頁 1911-1915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.22034/APJCP.2018.19.7.1911	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 該当する
1. 著者名 生駒俊和, 浅井孝夫, 遠藤和男, 土屋康雄	4. 巻 67
2. 論文標題 インドの胆嚢がん多発地域におけるリスク要因解明のための飲料水分析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学検査	6. 最初と最後の頁 760-765
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14932/jamt.18-29	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 該当する
1. 著者名 Shukla R, Shukla P, Behari A, Khetan D, Chaudhary RK, Tsuchiya Y, Ikoma T, Asai T, Nakamura K, Kapoor VK	4. 巻 22(2)
2. 論文標題 Roles of Salmonella typhi and Salmonella paratyphi in Gallbladder Cancer Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Asian Pacific Journal of Cancer Prevention	6. 最初と最後の頁 509-516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.31557/APJCP.2021.22.2.509	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ikoma T, Tsuchiya Y, Eguchi M, Mishra K, Behari A, Kapoor VK
2. 発表標題 Lack of association between genetic variants involved in lipid metabolism and gallbladder cancer risk in North Indians
3. 学会等名 8th Annual Conference of Molecular Pathology Association of India (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsuchiya Y, Mishra K, Behari A, Ikoma T, Kapoor VK
2. 発表標題 Polymorphism of DNA repair pathway gene and gallbladder cancer risk
3. 学会等名 APCON 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikoma T, Tsuchiya Y, Asai T, Endoh K, Puneet
2. 発表標題 Drinking water pollution and gallbladder cancer risk in northern India
3. 学会等名 APCON 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 V. Kapoor, Y. Tsuchiya, K. Mishra, R. Vishwakarma, A. Behari, T. Ikoma, T. Asai, K. Endoh, K. Nakamura
2. 発表標題 Helicobacter pylori and gallbladder cancer in India
3. 学会等名 13th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association (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	浅井 孝夫 (Asai Takao) (60612736)	新潟医療福祉大学・医療技術学部・講師  (33111)	
研究分担者	生駒 俊和 (Ikoma Toshikazu) (60612744)	北陸大学・医療保健学部・准教授  (33304)	
研究分担者	中村 和利 (Nakamura Kazutoshi) (70207869)	新潟大学・医歯学系・教授  (13101)	

	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
研究協力者	カプール ヴィナイ (Kapoor Vinay)		
研究協力者	シュクラ ラトナカール (Shukla Ratnakar)		
研究協力者	ミシュラ クムデッシュ (Mishra Kumudesh)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
インド	サンジャイガンジー医科学大学 院			