様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ７ 月　 ６ 日現在

機関番号：１１４０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ０９３４５

研究課題名（和文）口腔内細菌叢と食道腺癌・扁平上皮癌の関連

研究課題名（英文）Association of oral microbiome with esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma

研究代表者
飯島　克則（iijima, katsunori）

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：６０３７５００３

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）：食道扁平上皮癌患者10名、健常コントロール10名から唾液を採取し、唾液中の細菌叢解析を行った。主な属レベルで比較では、コントロールに比較して食道癌患者において、Veillonella、Neisseriaが低い傾向であった。Neisseriaは、アセトアルデヒド産生能が高い代表的な細菌であることが知られている。飲酒後のアセトアルデヒド暴露が、食道癌の要因の一つ考えられていることから、今回の食道癌患者でNeisseriaの検出割合が少ない結果は、予想外であった。このことから、口腔内細菌叢と癌との関連を明らかにするには、多くの症例から唾液サンプルを採取し、細菌叢全体での更なる解析が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
食道癌は、飲酒歴と強く関連しますが、アルコール自体には発癌作用はなく、アルコールが体内で分解される過程で生じるアセトアルデヒドに発癌作用があります。飲酒後のアセトアルデヒド生成は、遺伝的体質、口腔内細菌によって影響を受けることが知られています。今回の研究をもとに食道癌発生とかかわる口腔内細菌叢を明らかにすることで、口腔内衛生環境を保つことによって食道癌の予防につながることが期待されます。

研究成果の概要（英文）：Saliva samples were taken from 10 patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and 10 normal controls, DNA was extracted from each sample, and was subjected to 16S-based amplicon sequencing of microbiota analysis. On comparison of phylum level between the two groups, proportions of Bacteroidetes and Fusobacteria tended to be higher, and that of Proteobacteria tended to be lower in ESCC than controls. On comparison of genus level, the proportions of Veillonella and Neisseria tended to be lower in ESCC than controls. Neisseria is known to be a typical bacteria which produces acetaldehyde, a class I carcinogen, from ethanol, and is considered to be involved in the pathogenesis of ESCC in alcohol drinkers. Hence, the low proportion of saliva Neisseria in ESCC in the current study is somewhat unexpected. This suggests that whole microbiota analysis of saliva in larger number of cohort is required to clarify the complicated relationship between oral microbiome and ESCC.

研究分野：消化器内科

キーワード：口腔内細菌叢

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

食道癌は、世界の癌死亡の第６位であり、その予防対策は重要である。食道癌は組織別に扁平上皮癌、腺癌に大別され、そのうち扁平上皮癌は、喫煙・飲酒が主なリスクと考えられ、わが国では、現在、食道癌の９割以上を占めている。一方、腺癌は、逆流性食道炎、バレット食道からなる食道・胃逆流症(GERD)シークエンスから発生すると考えられ、近年、欧米における食道腺癌の罹患率は増加し、扁平上皮癌を上回るようになっている。食生活の欧米化、ヘリコバクター・ピロリ菌感染率の低下に伴い、GERD の有病率が増加し、本邦でも今後、バレット食道および腺癌の罹患率上昇が懸念される。食道癌の有効な予防策を構築する上でその病態の解明は重要であり、食道腺癌、食道扁平上皮癌の病態発生には、いずれも口腔内細菌叢と関連性が示唆されている。

申請者は、これまで硝酸塩を含む食事を摂取後、食道・胃接合部に限局して、高濃度の一酸化窒素が発生し、食道のバレット上皮化生・腺癌発生に至る可能性について報告してきた。この反応においては、口腔内細菌によって硝酸塩が亜硝酸塩に還元される必要がある。また、扁平上皮癌においては、アルコールが口腔内細菌によってアセトアルデヒドに変換され、それが唾液とともに嚥下されることで、口腔内、食道、胃の上部消化管の発癌リスクが高まると考えられる。

近年、次世代シークエンサーの普及により様々な細菌叢の網羅的な解析が比較的容易に行えるようになっており、食道腺癌、扁平上皮癌と口腔内細菌との関連性に関しても少数例報告されている。しかし、食道腺癌における口腔内亜硝酸塩産生菌、扁平上皮癌における口腔内アセトアルデヒド産生菌に着目した報告はない。このように口腔内細菌叢と食道の発癌との関連を解明することで、今後、口腔ケアや特定の菌種を対象とした治療介入の可能性を期待できる。

２．研究の目的

今回我々は次世代シークエンサーを用いた口腔内細菌叢の網羅的な解析を用いて、特定の機能を有する口腔内細菌と食道癌（亜硝酸塩生成能と腺癌、アセトアルデヒド生成能と扁平上皮癌）との関連を検証することを目的とする。

３．研究の方法

被検者から唾液を採取し、DNA 抽出・精製を行い、得られた DNA 溶液をもとに、次世代シークエンサーによる網羅的解析を用いて、食道腺癌、扁平上皮癌患者の口腔内細菌叢の特徴を健常者と比較することで検討する。得られたデータをもとに、主に門～種各階級での各群間における細菌叢比較、生物学的多様性の増減、主成分分析による群間での傾向の異同を軸に解析を加える。食道腺癌の検討では、前癌状態である逆流性食道炎、バレット食道患者も含めて対象とし、細菌の硝酸塩還元能に着目した解析を行う。食道扁平上皮癌の検討では、細菌のアセトアルデヒド生成能に着目して解析を行う。

まず、食道腺癌発症と関連する口腔内細菌叢を同定するために、食道腺癌患者、及び、その前駆状態であるバレット食道、逆流性食道炎患者と健常者の口腔内細菌叢を比較解析し、硝酸塩還元および N-ニトロソ化を介した発癌経路に寄与する鍵となる細菌の同定を試みる。次に、食道扁平上皮癌と健常者の口腔内細菌叢を比較し、アセトアルデヒド産生能の違いに着目して発癌と関連する口腔内細菌叢を同定する。

①逆流性食道炎、バレット食道患者の検討

口腔内細菌叢の比較解析：バレット食道/逆流性食道炎患者 30 名と年齢、性別をマッチさせた健常者を対象に同意を得た上で唾液を採取し、DNA 抽出・精製を行い、得られた DNA 溶液を元に口腔内細菌叢について解析を行う。

②食道扁平上皮癌患者の検討

食道腺癌は比較的希少疾患であるため症例の集積に時間を要し、当初の計画通り進まないことも想定される。一方、秋田県は、全国的に食道扁平上皮癌の発症率が高く、その多くが秋田大学病院に集積することから、症例の集積は比較的容易であると考えられ、食道腺癌の集積に時間を要する場合は、食道扁平上皮癌の検討を優先的に進めていくものとする。食道扁平上皮癌患者 30 名の登録を進め、症例集積次第、口腔内細菌叢の解析・検討を行う。

４．研究成果

食道扁平上皮癌患者１０名、健常コントロール１０名から唾液を採取し、唾液より得られた DNA 溶液をもとに、Illumina 社の 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation プロトコールに則り、次世代シークエンサーにて細菌叢解析を行った。２群間の主な門レベルの細菌叢の比較では（食道扁平上皮癌 vs. 健常コントロール）、*Bacteroidetes* (35.2% vs. 28.4%)、*Firmicutes* (30.1% vs. 27.5%)、Proteobacteria (10.3% vs. 18.4%)、*Fusobacteria* (5.3% vs. 4.3%)であり、コントロールに比較して、食道扁平上皮癌患者において、*Bacterroidetes* が多く、*Proteobacteria* が少ない傾向を認めた。次に主な属レベルで比較では（食道扁平上皮癌 vs. 健常コントロール）、*Prevotella* (30.4% vs. 28.3%)、*Streptococcus* (20.3% vs. 17.3%)、*Veillonella* (7.3% vs. 11.2%)、*Neisseria* (6.3% vs. 10.5%)、*Heamophilus* (3.7% vs. 4.4%)であり、コントロールに比較して、食道扁平上皮癌患者において、*Veillonella*、*Neisseria* が低い傾向であった。このうち、*Neisseria* は、アセトアルデヒド産生能が高い代表的な細菌であることが知られている。飲酒後のアセトアルデヒド暴露が、食道扁平上皮癌の要因の一つ考えられ

ていることから、今回の食道扁平上皮癌患者で *Neisseria* の検出割合が少ない結果は、予想外であった。このことから、口腔内細菌叢と癌との関連を明らかにするには、多くの症例から唾液サンプルを採取し、細菌叢全体での更なる解析が必要と考えられた。

一方、食道腺癌に関しては、稀な疾患であり、秋田大学附属病院のみでは症例の集積が難しかった。途中で、東北大学病院に協力を依頼し、同院の倫理委員会で も承認され、症例を集積中である。症例が１０例集まった時点で、解析を行う予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名	４．巻
Koizumi S, Motoyama S, Iijima K.	53
２．論文標題	５．発行年
Is the incidence of esophageal adenocarcinoma increasing in Japan? Trends from the data of a hospital-based registration system in Akita Prefecture, Japan.	2018年
３．雑誌名	６．最初と最後の頁
J Gastroenterol.	827-833
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1007/s00535-017-1412-4	有
オープンアクセス	国際共著
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	-

１．著者名	４．巻
Onochi Kengo、Shiga Hisashi、Takahashi So、Watanabe Noboru、Fukuda Sho、Ishioka Mitsuaki、Koizumi Shigeto、Matsuhasi Tamotsu、Jin Mario、Iijima Katsunori	53
２．論文標題	５．発行年
Risk Factors Linking Esophageal Squamous Cell Carcinoma With Head and Neck Cancer or Gastric Cancer	2018年
３．雑誌名	６．最初と最後の頁
Journal of Clinical Gastroenterology	164-170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1097/MCG.0000000000001019	有
オープンアクセス	国際共著
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	-

１．著者名	４．巻
Fukuda S, Shimodaira Y, Watanabe K, Takahashi S, Sugawara K, Suzuki Y, Watanabe N, Koizumi S, Matsuhashi T, Iijima K.	101
２．論文標題	５．発行年
Risks for Rebleeding and In-Hospital Mortality After Gastrointestinal Bleeding in a Tertiary Referral Center in Japan	2020年
３．雑誌名	６．最初と最後の頁
Digestion	31-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1007/s00535-017-1412-4	有
オープンアクセス	国際共著
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	-

〔学会発表〕　計0件

〔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