

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10629

研究課題名（和文）網羅的口腔内細菌叢の解析から検証する大腸癌発癌の機序

研究課題名（英文）Association carcinogenesis with oral microbiota in colorectal cancer

研究代表者

近藤 哲（Kondo, Satoru）

三重大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60763737

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）：潰瘍性大腸炎患者において直腸粘膜のDNAメチル化レベル、DMRsパネルが潰瘍性大腸炎患者関連大腸癌を高率に同定でき、有用なpredictive markerとなり得る可能性が示唆された。

大腸癌組織中のFusobacterium発現とMSI-H大腸癌との関連性が示され、MSI-H大腸癌の発癌と大腸におけるFusobacterium発現が関与する可能性が示唆された。また、口腔内細菌叢の解析には進めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果を用いることで、潰瘍性大腸炎患者における潰瘍性大腸炎関連大腸癌の発癌予測マーカーとなり得るほか、MSI-H大腸癌における発癌機序に腸内細菌が関与している新たな可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Specific miRNAs to be methylated and DMRs in rectal mucosal in patients with UC could be used to identify patients with UC at greatest risk for developing UC-CRC. Fusobacterium infection was detected in CRC tissues. Furthermore, Fusobacterium infection was significantly associated with MSI-H compared to non-MSI-H. Unfortunately, it is difficult to detect the oral microbiota and we could not process comprehensive analysis of oral microbiota.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 潰瘍性大腸炎 腸内細菌 マイクロサテライト不安定性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における大腸癌患者数は高齢化や生活様式の欧米化など様々な要因により増加しており、悪性新生物の中では肺癌、胃癌に次いで3番目に多く、女性では2003年以降最も死亡数が多い。アメリカでは20年間の一次予防の推進により、ある程度の大腸癌死亡率/罹患率の減少は認められてはいるが、その効果はまだ小さい。そこで、大腸癌死亡を予防するには、早期発見/早期治療による二次予防が必要になってくる。現在、有用な大腸癌検診方法(一次スクリーニング検査)としては、便潜血検査があげられる。Minnesota試験において便潜血検査を施行することで大腸癌死亡が33%減少しており、その他にも便潜血検査が大腸癌の発生率・死亡率を減少させる報告がされ、便潜血検査の大腸癌検診における有用性が認められてきた。しかしながら大部分の臨床試験では便潜血検査はがんの30~50%しか発見されておらず、その偽陰性率が高いことから、現在、感度・特異度ともに期待できる新たな一次スクリーニング検査の開発研究が focus されている。しかしながら、あくまでも一次スクリーニングであるため、今後は大腸癌発癌高リスク群を選別する新たなバイオマーカーの確立や、発癌メカニズムの解明が急がれる。

口腔内には未同定の細菌を含めると約700種、腸内フローラに匹敵するほどの常在細菌が生息することが知られている。口腔常在菌には強い病原性をもつ細菌は検出されないものの、口腔細菌は大量の唾液や咀嚼の圧力に抵抗し口腔内に定着するため、強い付着力と凝集性を有していることから、口腔細菌の密度は糞便中の腸内細菌よりも遙かに高い。

近年、歯周病がさまざまな全身性疾患の誘因となる可能性を示す基礎研究や臨床研究が数多く報告されており、口腔内の炎症が慢性化すると、炎症部位で炎症関連物質や炎症性サイトカインが産生され、血行性に全身に波及すると考えられ、慢性炎症性疾患・歯周炎は、細菌や炎症関連物質、そして炎症性サイトカインなどを持続的に全身に供給する「リザーバー」となり、全身疾患を誘導すると考えられている。大腸癌のリスクが高いことで知られる炎症性腸疾患の患者の腸管にも、口腔に由来する細菌種が顕著に蓄積していることが報告されている。これらの知見は大腸癌の病態形成における口腔細菌の重要性を示唆している。このような背景から、口腔内細菌と大腸癌の病態形成の解析が大腸癌の新たなリスク診断や予防的治療の開発の基盤となる可能性が考えられる。

本研究の進展は特定の口腔内細菌の定量などによる今後の大腸癌における新たなリスク診断や口腔ケアなどの予防的治療法の開発の基盤となる可能性を秘めた重要な成果であると言える。しかし一方で、未だ口腔細菌叢の攪乱と大腸癌を対象とした臨床研究は進んでおらず、その因果関係の解明は今後の大腸癌の克服を考える上で解決すべき重要な課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では大腸癌、潰瘍性大腸炎関連大腸癌、潰瘍性大腸炎、健常者における口腔内細菌叢と大腸腸内細菌叢の構成について解析をおこなうことで様々な観点からの特定細菌叢の同定を行い、その機能的役割や、形態学的な変化から大腸癌発癌のあらたな病態形成機序を解明し、それらの機序を利用した大腸癌発症リスク診断や予防的治療への可能性を提示することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

・DNA抽出(組織)

大腸癌組織179例の原発腫瘍、正常大腸粘膜に加えて、潰瘍性大腸炎関連大腸癌患者32例の直腸粘膜組織、潰瘍性大腸炎32例の直腸粘膜組織、潰瘍性大腸炎90例の大腸粘膜より採取したFFPE標本から抽出したDNAをQiamp FFPE Tissue Kit (Qiagen)を利用して抽出した。

・KRAS Codon12/13, BRAFv600E, MSI 解析

大腸癌組織より抽出したDNAを用いてcapillary sequencerによるdirect sequenceでKras codon12/13, BRAFv600Eを解析した。さらにMSIに関しては、BAT25, BAT26, NR-21, NR-24, NR-27の5つのマーカーを使用したフラグメント解析を行った。

・DNA methylation 解析

抽出したDNAをEZ DNA methylation Gold Kit (Zymo Research)を用いてBisulfite処理後、パイロシークエンス法でmiRNAsのメチル化レベルを定量した。

・Enrichment 解析

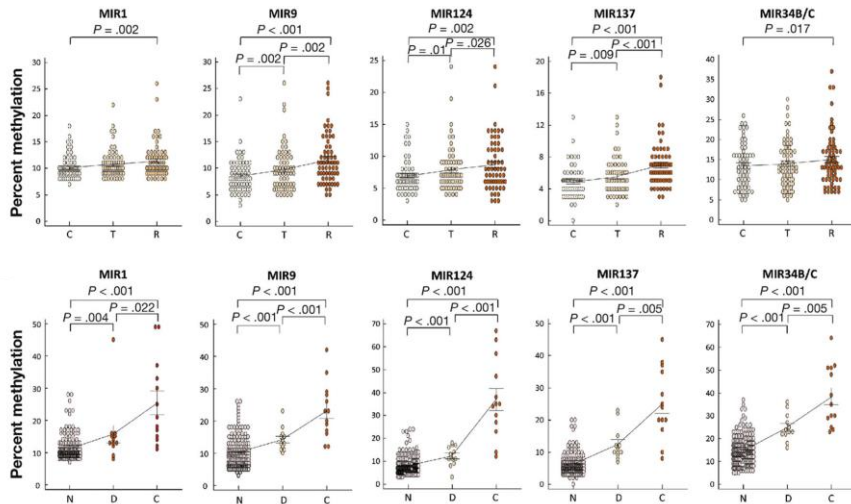
抽出したDNAをBisulfite処理後、Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina)で解析を行った。得られたデータはRを使って解析を行った。idat形式ファイルの読み込み、Quality control、正規化(BMIQ: Beta Mixture Quantile dilation)はChAMPを用いて実施した。抽出したdifferentially methylated regions(DMRs)について、Enrichment解析、Elastic Net classification algorithmを用いたLogistic regression解析を行った。

・細菌発現解析

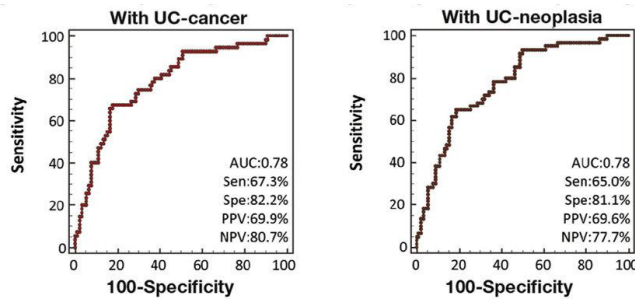
大腸癌組織、正常粘膜組織から抽出したDNAを用いて、qPCR法でtumor genomic DNA中のFusobacterium発現量を定量化した。

4. 研究成果

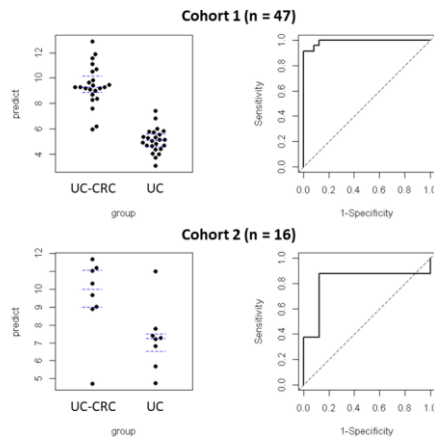
(1) 潰瘍性大腸炎患者の直腸粘膜では、miR-1,-9,-124,-137 のメチル化レベルは近位大腸粘膜、横行結腸粘膜に比べて有意に発現が高かった。さらに、炎症粘膜、dysplasia 組織、潰瘍性大腸炎関連大腸癌組織を比較すると癌組織で miR-1,-9,-124,-137 のメチル化レベルが有意に高い結果であった。



(2) 潰瘍性大腸炎関連大腸癌患者の直腸粘膜の miR-1,-9,34B/C,-124,-137 のメチル化レベルは、潰瘍性大腸炎患者の直腸粘膜に比べて有意に高値であり、潰瘍性大腸炎患者の直腸粘膜における miR-1,-9,34B/C,-124,-137 のメチル化パネルは潰瘍性大腸炎関連大腸癌を合併する潰瘍性大腸癌患者を高率に同定できた。

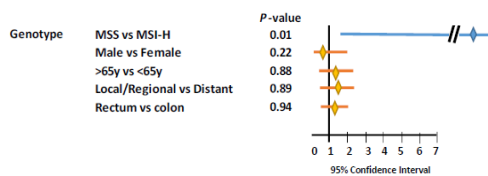


(3) 潰瘍性大腸炎患者 24 例と潰瘍性大腸炎関連大腸癌患者 24 例から 11 ヶ所の DMRs(SIX2, SATB2/SATB2-AS1, HAND2, GDNF, PLCXD3, HPSE2, TBX3, PAX9, MEIS2,SALL1, LGALS3BP)を抽出した。11 個の DMRs を用いたパネルでは潰瘍性大腸炎関連大腸癌を合併する潰瘍性大腸癌患者を高率に同定できた。



(4) Fusobacterium は大腸癌組織 179 例中 135 例(75.4%)に発現していた。Fusobacterium 発現量は MSS 大腸癌患者に比べて、MSI-H 大腸癌患者で有意に高値であった(p=0.0024)。直腸癌と比較して、大腸癌において Fusobacterium 発現量が有意に高値であった(p=0.047)。

Fusobacterium 発現と大腸癌患者の予後再発とは有意な相関は認めなかった。**Fusobacterium** 発現についての多変量解析では、**MSI-H** 大腸癌であることが有意に **Fusobacterium** 発現の有無と関連していたことから ($p=0.01$)、**Fusobacterium** 発現と **MSI-H** 大腸癌発癌との関連が示唆された。



成果のまとめ

潰瘍性大腸炎患者において直腸粘膜の DNA メチル化レベル、DMRs パネルが潰瘍性大腸炎患者関連大腸癌を高率に同定でき、有用な **predictive marker** となり得る可能性が示唆された。

大腸癌組織中の **Fusobacterium** 発現と **MSI-H** 大腸癌との関連性が示され、**MSI-H** 大腸癌の発癌と大腸における **Fusobacterium** 発現が関与する可能性が示唆された。また、口腔内細菌叢の解析には進めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toiyama Y, Okugawa Y, Kondo S, Okita Y, Araki T, Kusunoki K, Uchino M, Ikeuchi H, Hirota S, Mitsui A, Takehana K, Umezawa T, Kusunoki M.	4. 巻 9 (69)
2. 論文標題 Comprehensive analysis identifying aberrant DNA methylation in rectal mucosa from ulcerative colitis patients with neoplasia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 33149-33159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26032	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 -

1. 著者名 Toiyama Y, Okugawa Y, Tanaka K, Araki T, Uchida K, Hishida A, Uchino M, Ikeuchi H, Hirota S, Kusunoki M, Boland CR, Goel A	4. 巻 153
2. 論文標題 A Panel of Methylated MicroRNA Biomarkers for Identifying High-Risk Patients With Ulcerative Colitis-Associated Colorectal Cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1634-1646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1053/j.gastro.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 近藤 哲、荒木俊光、大北喜基、沖 哲、今岡裕基、北嶋貴仁、松下航平、藤川裕之、安田裕美、小池勇樹、奥川喜永、吉山繁幸、廣 純一郎、井上幹大、小林美奈子、大井正貴、問山裕二、内田恵一、楠 正人
2. 発表標題 クローン病術後の抗TNF- 抗体の維持治療についての検討
3. 学会等名 第72回日本大腸肛門病学会学術集会、福岡、2017.11.10
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Minoru Koi, Yoshiki Okita, Yoshinaga Okugawa, Takahito Kitajima, Yuji Toiyama, Erika Koeppel, Elena M Stoffel, John M Carethers.
2. 発表標題 FUSOBACTERIUM NUCLEATUM INFECTION ASSOCIATES WITH TWO TYPES OF MICROSATELLITE ALTERATIONS IN COLORECTAL CANCERS (CRC).
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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	問山 裕二 (Toiyama Yuji) (00422824)	三重大学・医学系研究科・准教授 (14101)	
研究分担者	奥川 喜永 (Okugawa Yoshinaga) (30555545)	三重大学・医学部附属病院・講師 (14101)	
研究分担者	楠 正人 (Kusunoki Masato) (50192026)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	