

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10641

研究課題名(和文) 加齢や炎症が腸管免疫活性に与える影響 - 大腸癌発生母地との関連

研究課題名(英文) The influence of aging and inflammation on intestinal immune activity

研究代表者

上田 貴威 (Ueda, Yoshitake)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：30625257

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)：初発大腸癌の症例に対し、手術前および術後の採便と採血を行い、16SrRNA解析で腸内細菌叢を同定した。その結果、術前はPrevotellaやBacteroidesなどの細菌叢が優勢であり、術後1カ月目では術前の60%程度までの状態にしか戻らないことを明らかにした。また、加齢による大腸粘膜の形態学的変化について、高齢者と非高齢者において粘膜上皮の陰窩の密度に差はないものの、高齢者は上皮の丈の高さが有意に低いことを明らかにした。さらに、大腸癌との関連が示唆されているF.nucreatumは、大腸癌の担癌者の腫瘍内、非癌部の陰窩内に存在し、非担癌者でも陰窩内に存在し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

大腸癌症例の術前および術後の腸内細菌叢の変化を16SrRNA解析した。これまでに同様の報告は国内外問わずなく、学術的意義は高いものと考えている。また、加齢による大腸粘膜上皮の形態学的変化については、加齢に伴い丈の高さが低くなっており、胃粘膜の萎縮と同様に大腸癌の発生に関して何らかの影響を及ぼしている可能性がある。大腸癌との関連が示唆されているF.nucreatumの検討に関しては、担癌者・非担癌者、加齢による変化、炎症マーカーとの関連の検討を今後も継続し、大腸癌発癌との関連を明らかにする予定である。これらが明らかになれば、現在増え続けている高齢者大腸癌に対する社会的意義は大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：For the case of primary colorectal cancers, stool and blood collection before and after the operation were carried out, and gut microbiome in colorectal cancer patients was identified by 16SrRNA analysis. The results revealed that gut microbiome, such as Prevotella and Bacteroides, predominated preoperatively and recovered up to only about 60% of preoperative state at 1 month after. We also determined that the morphological changes in the colonic mucosa with age did not differ in the density of crypts in the mucosal epithelium between the elderly and non-elderly, but the elderly had a significantly lower epithelial height. In addition, F. nucreatum, which has been suggested to be associated with colorectal cancer, revealed that it is present in the tumor and the crypt of intestinal mucosa in patients with colorectal cancer, and in the crypts in patients with non-colorectal cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大腸癌 加齢 炎症 細菌叢 腸管免疫

1. 研究開始当初の背景

我が国は、超高齢社会の到来を迎えている。これに伴い、癌患者数も急増しており、国民の2人に1人が癌に罹患する時代となっている。40歳以上のすべての年齢層において、死因の第一位を占める癌は、加齢現象の一つであると言える。癌の中でも消化器癌は最も罹患率の高い癌腫であり、特に大腸癌の罹患率および死亡率は、男女共、増加の一途を辿っている。それゆえ、大腸癌発癌のメカニズムの解明と大腸癌の予防法の開発は重要な課題である。

大腸癌の発癌には、adenoma-carcinoma シークンスや de novo 発癌等があることが知られており、これまでに原因遺伝子の解析も行われてきた。また、遺伝要素以外にも、潰瘍性大腸炎に代表される大腸の炎症性疾患 (IBD) により発癌のリスクは増加する。Colitis-associated colorectal cancer (CAC) は、炎症性腸疾患を素地とし、腸管局所で生じる慢性炎症およびその修復過程における遺伝子情報の異常発現などに起因する疾患概念が提唱されている。このような IBD や大腸癌の発生について、常在性の非病原性腸内細菌叢およびそれに関連する腸管免疫が重要な役割を果たす可能性が検討されてきた。ヒトの腸管内は、500~1000種類にも及ぶ腸内細菌が共存し、これらの細菌叢の乱れにより炎症へと伸展することが知られている。健常者では、腸管免疫システムにおいて、IgA 抗体の産生を介した制御性 T 細胞とバランスのとれた腸内細菌叢の相互作用によって、健全な腸管免疫系を形成し炎症は回避されている (Immunity 2014; 41(1):152-65)。しかし、IBD や感染性腸炎患者の大腸粘膜上皮細胞においては、健常者では発現を認めない MHC class II (HLA-DR) 抗原を発現しており、粘膜下炎症細胞 (感作リンパ球) の活性化によって連続的に炎症が誘導されている (J Clin Invest 1990; 86:1225-1260)。この腸管免疫機構の破綻が、腸管上皮細胞を活性化し、腸内細菌に対する異常な免疫応答による炎症が腸管障害を引き起こすと考えられている。さらに、マウスでは腸炎の際に浸潤するマスト細胞が、プロスタグランジン D2 (PGD2) を産生し、この PGD2 が腸炎の重症化やそれに続く大腸癌の発症を強く抑制する作用を持つことも示されている (Cancer Res 2014; 74(11): 3011-19)。また、APC (adenomatous polyposis coli) 遺伝子変異と癌修復遺伝子変異を有するマウスでは、腸内細菌により産生される酪酸が β -catenin を活性化し、上皮細胞の異常増殖をきたすことも明らかにされた (Cell 2014; 17; 158(2): 288-99)。このように、腸内細菌に対する過剰な免疫応答を特徴とする腸管免疫機構の破綻が、大腸癌の発癌に大きく関与している。一方、これらの腸管免疫系は、加齢にともなって機能が変化することが報告されている。しかし、加齢による腸内細菌叢や腸管免疫系の変化が、腸管への炎症や発癌に及ぼす影響については未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、加齢や炎症が腸管上皮の構築や腸内細菌叢および腸管免疫へどのような影響をおよぼすかを解明し、さらにそれらの変化が大腸癌の発生母地となる可能性について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 加齢による大腸上皮腺管構造の変化、腸管免疫の活性化および腸内細菌叢の変化への影響
【検討項目】

- 加齢による大腸上皮の変化
- 腺管構造の形態学的変化 (HE 染色、電子顕微鏡による観察)
- 加齢による大腸粘膜下層・大腸パイエル板における免疫細胞の活性化の変化
- 以下の項目を、免疫組織学的手法にて比較し、加齢が及ぼす免疫細胞の変化を解析する
EGF・線維芽細胞・炎症細胞浸潤の程度、IgA・IgG (腸管免疫の指標)
- 免疫担当細胞の表面マーカー：CD4・CD8⇒細胞性免疫と液性免疫のバランスの評価
- 炎症性サイトカイン (TNF・IL-1, 6, 8, 12 など) ⇒炎症性サイトカイン誘導の有無を解析
- IL-10, TGF- β , VEGF・プロスタグランジン D2 ⇒加齢による免疫抑制因子産生の有無を解析
- 加齢による大腸粘膜上皮内の細菌叢の変化
- in situ hybridization による凍結切片内粘膜上皮からの粘膜状上皮内細菌の検出
- 免疫組織化学染色法による腸内細菌 (Fusovacterium nucleatum など) の観察
- レクチンプロファイリング
- 超高齢者と非高齢者の大腸上皮のシグナル比を算出し、その相違や臨床病理学的因子との関連を検討

(2) 腫瘍性病変における腸管免疫の活性化および腸内細菌叢の変化への影響

【検討項目】

以下の4つの変化や関連について検討する(手法は前述の1に順ずる)。

正常上皮 - 腺腫 - 早期癌の病変近傍の大腸粘膜下層の免疫細胞の活性の変化。

正常上皮 - 腺腫 - 早期癌の病変近傍の大腸パイエル板における免疫細胞の活性化の変化。

正常上皮 - 腺腫 - 早期癌の病変近傍の大腸粘膜上皮内の細菌叢の変化。

正常上皮 - 腺腫 - 早期癌の病変近傍の大腸粘膜上皮のレクチンプロファイリングを行い、その相違や臨床病理学的因子との関連を検討する。

4. 研究成果

(1) 大腸癌患者の術前・術後の腸内細菌叢の変化

・まず、大腸癌患者の術前・術後の腸内細菌叢の変化を検討した。

・2016年11月~2018年10月までの2年間、初発大腸癌 cStage 0~ の48症例に対し、術後1・3・7日目、術後1ヶ月目に便と血液を採取し、16SrRNA解析で腸内細菌叢を同定した。これらを、患者背景、手術所見、術後経過にて評価し、術前・術後の腸内細菌叢変化として細菌数の変化、細菌叢の構成、細菌叢の分布を評価し、さらに腸内細菌叢変化に影響する因子を検討した。

・結果は以下の通りであった。

腸内細菌叢の属レベルの変化は、術後1日目から漸減し7日目に最小となり、1ヶ月時点でも術前のレベルの60%程度までしか回復していなかった。

細菌叢の構成では、術前はPrevotellaやBacteroidesなどの細菌叢が優勢であり、術後1カ月目では術前の60%程度の状態までには戻っていなかった。

腸内細菌叢の変化に影響を与えた因子は、手術のアプローチ法と回腸人工肛門の有無であった。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

これまでに同様の報告は国内外になく、インパクトは大きいと考える。上記の結果は、2019年の第74回日本消化器外科学会のワークショップ「腸内細菌叢と外科治療」にて報告した。

また、現在、「Perioperative change of gut microbiome in colorectal cancer patients: a prospective cohort study」のタイトルにて論文投稿中である。

今後の展望

本研究は術後3年まで、外来にて便を採取し、腸内細菌叢の変化をフォローする予定としており、長期的な変化についても今後検討をしていく。

(2) 加齢による大腸上皮腺管構造の変化

・加齢による大腸粘膜の形態学的変化を同定するため、2017,2018年の大腸癌切除標本を用いて、高齢者と非高齢者の形態変化の有無を検討した。結果は、以下の通りであった。

高齢者と非高齢者において粘膜上皮の杯細胞の密度に差は認めなかった。

(高齢者 vs. 非高齢者 = 14.5% vs. 14.7%, NS)

上皮の丈の高さは、高齢者において有意に低かった。

(高齢者 vs. 非高齢者 = 359 μm vs. 538 μm, p<0.01)

今後の展望

高齢者・非高齢者ともに、さらに検討数を増やして、上皮の丈の高さの変化をさらに検討していく

(3) 加齢による腸管細菌(特にF.nucreatum)の変化

・免疫染色によりF.nucreatumの有無・局在、および高齢者と非高齢者での相違を検討した。現在、検討途中であるが、これまでに明らかとなった事象は以下の通りである。

大腸癌の切除検体にて観察したところ、担癌者は腫瘍内、非癌部の陰窩内に存在し、非担癌者にも陰窩内にF.nucreatumが存在していた。高齢者・非高齢者共に、F.nucreatumの陽性率は80%であり、有意差は認めなかった。

生検検体を用いて同様に観察したところ、症例数がまだ少ないものの、高齢者では担癌(腫瘍内・陰窩内)、非担癌者(陰窩内)ともに存在していた。非高齢者では、担癌者の陰窩内に存在しており、非担癌者には存在していなかった。

(4) 加齢と腸管細菌(特にF.nucreatum)に対する免疫反応の関連

・腸管細菌(特にF.nucreatum)に対する免疫反応、およびこれらと加齢の関連を検討するため、免疫担当細胞の表面マーカー(CD4, CD8)、腸管免疫の指標(IgA, IgG)、炎症マーカー(IL-8, IL-10)の免疫染色を行い、加齢やF.nucreatumとこれらの免疫応答の関連を検討した。

・検討数が少ないものの、現在、以下のような結果を得ている。

高齢者では、IgAはびまん性に染色され、F.nucreatumとの関連はみられなかった。CD4, IgGはF.nucreatumの局在とよく一致しており、液性免疫との関係性が示唆された。また、CD8もびまん性に染色され、F.nucreatumとの関連はみられなかった。

非高齢者では、IgA はびまん性に染色され、F.nucreatum との関連はみられなかった。CD4、IgG も F.nucreatum との関連はみられなかった。一方、CD8、IgA は、F.nucreatum の近傍で染色されており、細胞性免疫との関係性が示唆された。

- ・これらの結果より、加齢による免疫応答の変化、およびそれらに F.nucreatum が関連している可能性が示唆された。

今後の展望

検討数が少ないため、今後、さらに検討数を増やし、上記の仮説が立証されるかを検討していく。現在、加齢による免疫応答の変化、およびそれらによる F.nucreatum への影響やさらに大腸癌の発癌・進行等との関連を検討した報告はないことから、これらが明らかとなった場合のインパクトは大きいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原貴生, 白下 英史, 松本 昂, 平塚 孝宏, 赤木 智徳, 上田 貴威, 當寺ヶ盛 学, 衛藤 剛, 白石 憲男, 猪股 雅史
2. 発表標題 大腸癌患者における周術期の腸内細菌叢変化の検討: 前向きコホート研究
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会 ワークショップ「腸内細菌叢と外科治療」
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	猪股 雅史 (Inomata Masafumi) (60315330)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	衛藤 剛 (Etoh Tsuyoshi) (00404369)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	
研究分担者	白石 憲男 (Shiraishi Norio) (20271132)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	平下 禎二郎 (Hirashita Teijiro) (10527758)	大分大学・医学部・病院特任助教 (17501)	