

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2020

課題番号：17KK0195

研究課題名（和文）消化器癌のバイオマーカー開発のためのmicrobiomeとエピジェネティクス解析

研究課題名（英文）Analysis of microbiome and epigenetics for the development of novel biomarker in Gastrointestinal cancers

研究代表者

馬場 祥史（BABA, Yoshifumi）

熊本大学・病院・特任准教授

研究者番号：20599708

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：Fusobacteriumは歯周病の原因菌として知られているが、食道癌の悪性度へ関与する。また、癌におけるエピジェネティクスにおいてゲノム全体の低メチル化は重要である。そこで、食道癌におけるFusobacteriumとLINE-1メチル化（ゲノム全体のメチル化レベルの指標）との関係を国際共同研究で検討した。F. nucleatum陽性症例ではLINE-1メチル化レベルが有意に低かった。さらに、興味深いことに、LINE-1高メチル化症例ではF. nucleatum陽性症例が予後不良であるが、LINE-1低メチル化症例ではそのような関係は認めないことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌叢はプロバイオティクス（Probiotics；人体に有益な腸内細菌叢ならびにこれらを含む食品・製品）やプレバイオティクス（Prebiotics；腸内細菌叢のバランスを改善する作用がある物質）により後天的に変化させることができる。今後の研究において、食道扁平上皮癌におけるFusobacteriumとエピジェネティクスの関係がより詳細に解明されれば、がん治療の新たな創薬に繋がる可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：We previously demonstrated the relationship of human microbiome Fusobacterium nucleatum with unfavorable clinical outcomes and inferior chemotherapeutic responses in esophageal cancer. Global DNA methylation is associated with the occurrence and development of various cancers. In our previous study, LINE-1 hypomethylation (i.e., global DNA hypomethylation) was associated with a poor prognosis in esophageal cancer. As the gut microbiota may play crucial roles in the DNA methylation of host cells, we hypothesized that F. nucleatum might influence LINE-1 methylation levels in esophageal cancer. F. nucleatum DNA was related to the LINE-1 hypomethylation of tumor lesions in esophageal cancer ( $P < 0.0001$ ). We found that the impact of F. nucleatum on clinical outcomes was not modified by LINE-1 hypomethylation (for interaction  $P = 0.014$ ).

研究分野：外科腫瘍学、腫瘍免疫学、腸内細菌、エピジェネティクス

キーワード：腸内細菌 食道癌 エピジェネティクス LINE-1 Fusobacterium nucleatum

様式 F - 19 - 2

### 1. 研究開始当初の背景

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いる (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)。

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。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) が消化器癌のエピゲノム (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ている。

### 2. 研究の目的

ハーバード大学ダナ・ファーマー癌研究所 Molecular Pathological Epidemiology (MPE) Laboratory と共同で、消化器癌における 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) の関連を解明することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

申請者は、2019 年 3 月 26 日に渡米し、9 月末までダナ・ファーマー癌研究所で共同研究を行った。

### 4. 研究成果

ダナ・ファーマー癌研究所のコホートをを用いて、大腸癌において Fusobacterium と autophagy との関係を示すことができ、共著者として J Pathol 誌に発表した。また、大腸癌パラフィン包埋組織を用いたメタボローム解析についても従事し、その結果は Mol Cancer Res 誌に発表している (図 1)。さらに、machine learning による大腸癌組織中の免疫細胞の網羅的解析に関しても従事し、その結果は Clin Cancer Res 誌に掲載された。腫瘍免疫細胞の中でも腫瘍関連マクロファージの多重蛍光免疫染色による評価に関しても従事し、その研究成果は Cancer Immunol Res 誌に発表した (図 2)。

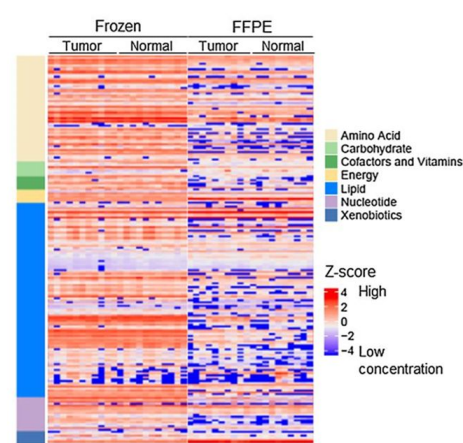


図1: パラフィン包埋組織を用いたメタボローム解析

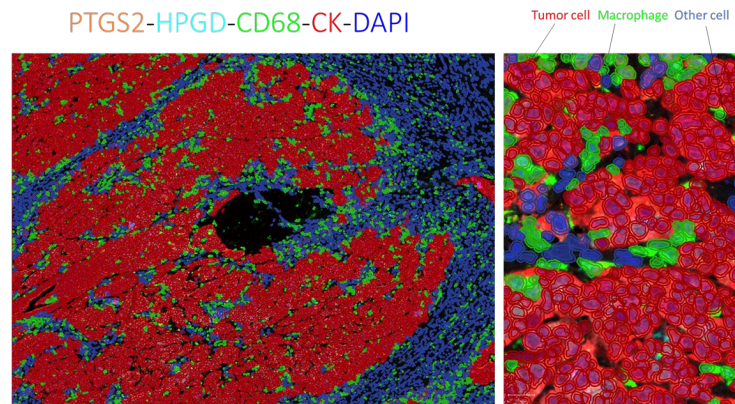


図2: 免疫細胞の多重蛍光免疫染色

- 1) Haruki K, Kosumi K, Hamada T, Twombly TS, Väyrynen JP, Kim SA, Masugi Y, Qian

ZR, Mima K, **Baba Y**, da Silva A, Borowsky J, Arima K, Fujiyoshi K, Lau MC, Li P, Guo C, Chen Y, Song M, Nowak JA, Nishihara R, Yanaga K, Zhang X, Wu K, Bullman S, Garrett WS, Huttenhower C, Meyerhardt JA, Giannakis M, Chan AT, Fuchs CS, Ogino S.

Association of autophagy status with amount of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer. **J Pathol** 2020 Apr;250(4):397-408

- 2) Väyrynen JP, Lau MC, Haruki K, Väyrynen SA, Dias Costa A, Borowsky J, Zhao M, Fujiyoshi K, Arima K, Twombly TS, Kishikawa J, Gu S, Aminmozaffari S, Shi S, **Baba Y**, Akimoto N, Ugai T, da Silva A, Song M, Wu K, Chan AT, Nishihara R, Fuchs CS, Meyerhardt JA, Giannakis M, Ogino S, Nowak JA.

Prognostic Significance of Immune Cell Populations Identified by Machine Learning in Colorectal Cancer Using Routine Hematoxylin & Eosin Stained Sections.

**Clin Cancer Res.** 2020 15;26(16):4326-4338

- 3) Arima K, Lau MC, Zhao M, Haruki K, Kosumi K, Mima K, Gu M, Väyrynen JP, Twombly TS, **Baba Y**, Fujiyoshi K, Kishikawa J, Guo C, Baba H, Richards WG, Chan AT, Nishihara R, Meyerhardt JA, Nowak JA, Giannakis M, Fuchs CS, Ogino S.

Metabolic Profiling of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues Discriminates Normal Colon from Colorectal Cancer. **Mol Cancer Res.** 2020;18(6):883-890

- 4) Väyrynen JP, Haruki K, Lau MC, Väyrynen SA, Zhong R, Dias Costa A, Borowsky J, Zhao M, Fujiyoshi K, Arima K, Twombly TS, Kishikawa J, Gu S, Aminmozaffari S, Shi S, **Baba Y**, Akimoto N, Ugai T, da Silva A, Guerriero JL, Song M, Wu K, Chan AT, Nishihara R, Fuchs CS, Meyerhardt JA, Giannakis M, Ogino S, Nowak JA.

The prognostic role of macrophage polarization in the colorectal cancer

microenvironment **Cancer Immunol Res.** In press

帰国後、それら習得した研究解析手法を用いて食道癌を中心とした上部消化管癌における腫瘍免疫と LINE-1 メチル化の関連を解析した。

食道癌 305 症例の *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) の DNA 量を定量リアルタイム PCR 法にて測定した。さらに、それらの症例において LINE-1 メチル化レベルを pyrosequencing technology を用いて評価した。すると、*F. nucleatum* 陽性症例では LINE-1 メチル化レベルが有意に低いことが分かった。

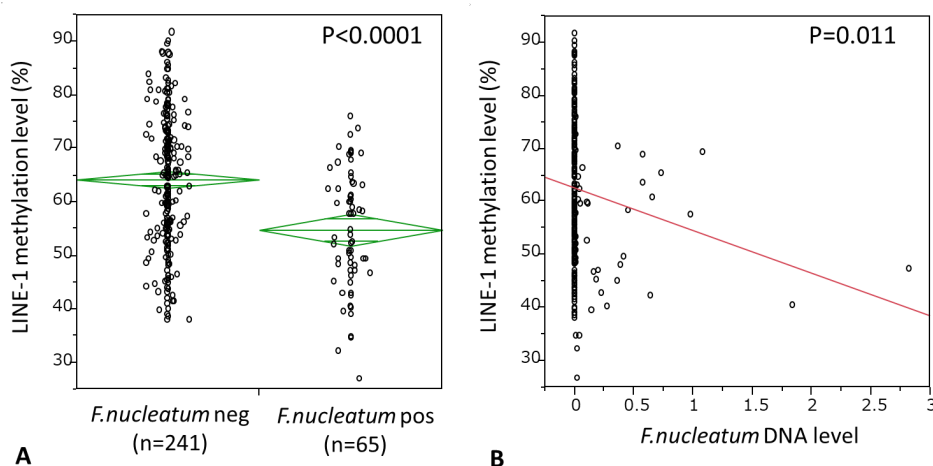


図3: *Fusobacterium nucleatum* と LINE-1 メチル化レベルの関係

我々は、これまで *F. nucleatum* 陽性食道癌症例が有意に予後不良であることを報告していた。

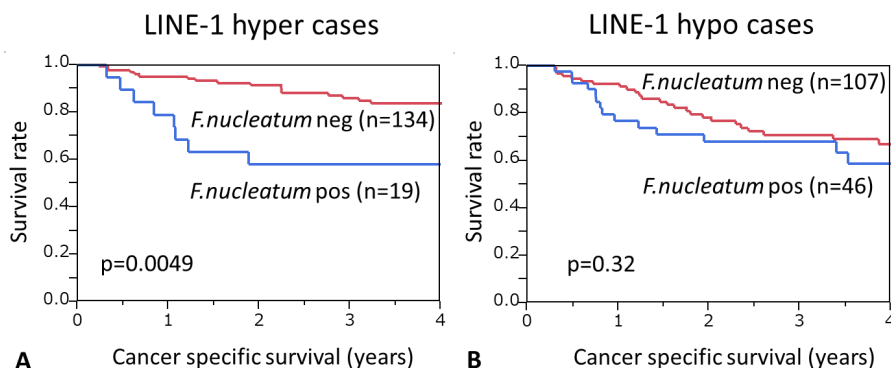


図4: *Fusobacterium nucleatum* と LINE-1 メチル化、予後の関係

興味深いことに、LINE - 1 高メチル化症例では *F. nucleatum* 陽性症例が予後不良であるが、LINE - 1 低メチル化症例ではそのような関係は認めないことが分かった。現在は、これらの結果を国際腫瘍学雑誌に投稿している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Vayrynen JP, Baba Y, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 The Prognostic Role of Macrophage Polarization in the Colorectal Cancer Microenvironment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 8~19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2326-6066.CIR-20-0527	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 Vayrynen JP, Baba Y, et al.	4. 巻 26
2. 論文標題 Prognostic Significance of Immune Cell Populations Identified by Machine Learning in Colorectal Cancer Using Routine Hematoxylin and Eosin-Stained Sections	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4326~4338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-20-0071	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 Arima K, Baba Y, Ogino S et al.	4. 巻 18
2. 論文標題 Metabolic Profiling of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues Discriminates Normal Colon from Colorectal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 883~890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-19-1091	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 Arima K, Lau MC, Zhao M, Haruki K, Kosumi K, Mima K, Gu M, V&ampl;rynen JP, Twombly TS, Baba Y, Fujiyoshi K, Kishikawa J, Guo C, Baba H, Richards WG, Chan AT, Nishihara R, Meyerhardt JA, Nowak JA, Giannakis M, Fuchs CS, Ogino S	4. 巻
2. 論文標題 Metabolic Profiling of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues Discriminates Normal Colon from Colorectal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	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) 10.1158/1541-7786.MCR-19-1091	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 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(6)
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 Okadome Kazuo, Baba Yoshifumi, Yagi Taisuke, Kiyozumi Yuki, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Watanabe Masayuki, Baba Hideo	4. 巻 271(4)
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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 馬場祥史
2. 発表標題 バイオマーカー開発を目指した食道癌における腫瘍免疫及び免疫チェックポイントの網羅的検討
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬場祥史
2. 発表標題 食道癌における腫瘍免疫の網羅的解析；免疫関連バイオマーカー開発を目指して
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

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-kB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 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

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
アメリカ	Dana-Farber Cancer Institute			