

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07276

研究課題名(和文) 腸内細菌による大腸腫瘍初期病変の異なる分子サブタイプ誘導に関する検討

研究課題名(英文) Microbiota in colorectal tumor molecular subtype

研究代表者

田原 智満 (TAHARA, Tomomitsu)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：80533968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は大腸腫瘍初期病変臨床検体を用い、分子サブタイプごとの細菌プロファイルを行い、異なる大腸腫瘍の分子サブタイプを規定しうる細菌を同定、さらに、因果関係を評価するために動物モデルを用い感染実験を行うことである。大腸腫瘍腫病変(n=280)の腫瘍部・背景粘膜由来DNAの抽出、候補遺伝子変異・メチル化解析のためのアッセイの構築とFusobacterium nucleatum、Fusobacterium whole speciesに関してリアルタイムPCRを施行したところで研究期間終了となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸腫瘍初期病変臨床検体の分子異常に関わる細菌叢の同定は、発癌メカニズムの理解、化学予防や新規治療開発の観点より意義はあると考えられる。補助機関終了後も本研究は我々の研究室の研究テーマである「消化器炎症・癌患者の臨床検体を用いたGenetic/epigenetic異常の解析と予後に関する検討」の一端として継続予定であり、科研費により購入した解析試薬を用い収集した大腸腫瘍サンプルに関して、候補遺伝子解析をもとにした、分子サブタイプによる分類、細菌解析として、次世代シーケンサーを用いた網羅的細菌解析を行う予定としている。

研究成果の概要(英文)：Our goal was to investigate molecular subtypes of colorectal precancerous lesions in relation to the microbiome signatures through both translational and basic animal studies. We obtained genomic DNA from clinical samples of colorectal precancerous lesions and developed assays for mutation and methylation analysis. We also examined Fusobacterium nucleatum and Fusobacterium whole species using qPCR but the supported study period terminated before additional experiments.

研究分野：消化器内科

キーワード：大腸腫瘍初期病変 細菌叢 分子異常 DNAメチル化 遺伝子変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のメタゲノム解析により腸内細菌と各種疾患との関連が注目されている。特に、大腸癌において、腫瘍組織内に口腔内常在菌であるフソバクテリウムの集積が認められることが報告され、病態との関連が注目されている。報告者らは CIMP 陽性大腸癌において、フソバクテリウムの高度集積が認められること (Cancer Res. 2014)、フソバクテリウムの高度集積は大腸癌の高リスクである潰瘍性大腸炎 (UC) 患者の炎症粘膜において極めてユニークな遺伝子メチル化プロファイルをもたらすことをゲノムワイド解析により見出した (Oncotarget 2017)。本研究の当初の目的は大腸腫瘍初期病変臨床検体を用い、分子サブタイプごとの細菌プロファイルを行い、異なる大腸腫瘍の分子サブタイプを規定しうる細菌を同定、さらに、因果関係を評価するために動物モデルを用い感染実験を行うことであった。大腸腫瘍病変 (n=280) の腫瘍部・背景粘膜由来 DNA の抽出、候補遺伝子変異・メチル化解析のためのアッセイの構築と *Fusobacteriumnucleatum*、*Fusobacteriumwhole species* に関してリアルタイム PCR を施行したところで研究期間終了となった。

2. 研究の目的

本研究では“異なる腸内細菌叢が大腸腫瘍の固有の分子サブタイプを規定する”との仮説にもとづき大腸癌、大腸腺腫、および過形成性ポリープの臨床検体における腸内細菌叢を網羅的に解析し、分子サブタイプとの関連を検討すること、さらに、腸内細菌による大腸腫瘍の異なる分子サブタイプ形成におけるメカニズムを詳細に検討する目的で、特定菌種の腸内細菌の経口投与を行った大腸発癌モデルの大腸癌初期病変である異型陰窩巣 (ACF) における遺伝子メチル化、遺伝子変異を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

具体的な計画として、臨床検体を用い、大腸癌・大腸腺腫・過形成性ポリープの腫瘍部及び背景腸粘膜に集積する腸内細菌叢を次世代シーケンサーにより検索、CpG island methylator phenotype (CIMP)、P53、KRAS、BRAF 遺伝子変異及びマイクロサテライト不安定性との関連を検討、さらに、特定の腸内細菌層の経口投与を行った Azoxymethane (AOM) 誘発マウス大腸発癌モデルの大腸癌初期病変、異型陰窩巣 (ACF) における遺伝子メチル化、遺伝子変異を解析し、遺伝子発現との関連を検討する。遺伝子メチル化、遺伝子変異の解析は上記の候補遺伝子解析に加え、エクソームシーケンス、メチル化アレイなどによる網羅的解析の両面より行い、特定の腸内細菌叢によりもたらされる分子生物学的異常をカタログ化する。特定の腸内細菌感染によりもたらされる大腸腫瘍の分子異常の Pathway を同定し、化学予防や治療につながる知見を同定することを目的とした。

研究期間中、大腸腫瘍病変 (n=280) の腫瘍部・背景粘膜に関して、内視鏡切除材料由来のサンプルよりゲノム DNA を抽出し遺伝子変異・メチル化解析を念頭に濃度調整を行い、一部をバイサルファイト反応を行い凍結保存した。上記コホートについては臨床情報 (性、年齢、病変サイズ、肉眼形態、部位、病理結果) を取得したデータの整理を進めている。細菌解析・腫瘍ゲノム解析は、*Fusobacteriumnucleatum*、*Fusobacteriumwhole species* に関してリアルタイム PCR を施行した。候補遺伝子変異である KRAS (EXON2) APC (EXON15) BRAF (V600E) に関して、プライマーをデザインし、実験条件を確認した。候補遺伝子メチル化である MINTs, MLH1 などに関して、プライマーをデザインし、実験条件を確認した。さらに既報をもとに、各臓器における炎症・腫瘍疾患でメチル化が報告されている遺伝子 45 個を新たに選定、パイロシーケンスプライマーを専用ソフトを用いデザインした。

4. 研究成果

2019 年度、2021 年度の 2 度にわたる代表者異動に伴い実験がストップしてしまい、2021 年度から実験室を立ち上げ実験を再開したが現在は対象サンプルの *Fusobacteriumnucleatum* *Fusobacteriumwhole species* 解析、一部のバイサルファイト反応が行われたのみであり、大部分の実験が未施行の状況で最終年度終了となってしまった。本研究の当初の目的は大腸腫瘍初期病変の分子サブタイプごとの細菌プロファイルを行い、異なる大腸腫瘍の分子サブタイプを規定しうる細菌を同定、さらに、因果関係を評価するために動物モデルを用い感染実験を行うこ

とであった。しかし、科研費事業終了後も本研究は報告者らの研究室の研究テーマである「消化器炎症・癌患者の臨床検体を用いた Genetic/epigenetic 異常の解析と予後に関する検討」の一端として継続予定であり、科研費により購入した解析試薬を用い収集した大腸腫瘍サンプルに関して、候補遺伝子解析をもとにした、分子サブタイプによる分類、細菌解析として、次世代シーケンサーを用いた網羅的細菌解析を行う予定としている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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

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
---------	---------