

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15788

研究課題名（和文）大腸癌の発育進展に関与する常在微生物F.nucleatumの解析と予防法の探索

研究課題名（英文）The relation of colorectal carcinogenesis with F. nucleatum analysis and the prevention

研究代表者

菅野 伸一（Kanno, Shinichi）

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20782254

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：腸内細菌叢を構成しているF. nucleatumが発癌との関連性があることが報告され、マイクロサテライト不安定性（MSI）大腸癌でその発現頻度が有意に多いことが報告されている。日本人のMSI大腸癌の頻度が欧米人よりも低いとの報告が多いが、これらの解析結果は人種や地域差による大腸癌組織内のF. nucleatum陽性率や発現量の違いがMSIの頻度に影響を与えている可能性も示唆している。よって人種や地域差に関わらず腸内のF. nucleatumとMSIとの間に有意な相関がみられたことは、その発癌メカニズムを明らかにする上で興味深い研究成果であると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は従来までF. nucleatum研究で用いられていない小さな大腸腫瘍とその周囲の正常粘膜の臨床検体をサンプルとする新たな試みである。その成果によりF. nucleatumが正常のヒト大腸粘膜や小さなポリープ内で腫瘍発生・増殖を促していることが示された場合、癌予防におけるF. nucleatumの重要性は高まると考えられる。また米国のコホート研究で食物繊維が豊富な食事がF. nucleatum陽性大腸癌のリスクを低下させるとの報告がなされたことで、F. nucleatumを標的とした大腸癌予防の現実味は増しており、本研究の動物実験の成果はヒトへの介入研究の礎の一つとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The association between highly enriched F. nucleatum in colorectal carcinoma tissues, and MSI-high status was observed in both the U.S. cohort studies and Japanese population-based study. Previous studies have reported that the frequency of colorectal cancers with MSI-high status in Japan (less than 10%) tend to be lower than those in U.S. and Western countries (about 15%). Therefore, the low rate of MSI-high in Japanese colorectal cancer might be due to the amount of F. nucleatum in carcinoma tissues, because our current data showed that the rate of F. nucleatum positivity in Japanese patients was lower than that in the U.S. cohorts.

研究分野：消化管腫瘍

キーワード：大腸癌 F. nucleatum microbiota MSI Probiotics 免疫応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトの体内に膨大に存在する microbiome(生物環境を構成する微生物群ゲノムの総称)と各疾患の関連についての研究が急速に発展している。microbiome の多くは腸管内に存在し、腸内細菌叢を構成している。この細菌叢の異常が代謝、免疫に重要な役割を担っていることが明らかになってきており、最近では各種消化器癌に関与していることが報告されている。大腸癌に関する報告では、腸内細菌叢を構成している嫌気性菌の *Fusobacterium* 属が癌部で発現亢進し、発癌との関連性があることが報告され、欧米での報告で *F. nucleatum* によって MLH1 遺伝子のメチル化が引き起こされることから、*F. nucleatum* 陽性群ではマイクロサテライト不安定性 (MSI) 大腸癌が有意に多いことが報告された。

F. nucleatum の大腸癌発生・増殖への関与は基礎研究で明らかにされ始めている。細胞に存在する E-cadherin と結合し、大腸癌細胞の β -catenin を活性化させ、NF- κ B の転写を促進、炎症を惹起させている。また、Toll-Like Receptor 4 を刺激することにより細胞内の microRNA-21 の増加を介して RAS 経路を活性化させ、細胞増殖や血管増生を促進、細菌に対する免疫力の低下を生じていることが報告されている。

大腸癌は現在の本邦における罹患数、死亡数は男女を合わせると第一位、第二位の癌腫であり、予防法の発見は国民の大きな利益となる。最新のコホート研究では食物繊維が豊富な食事は *F. nucleatum* 陽性大腸癌のリスクを低下させるとの報告がなされている。これは食物繊維摂取というコストの低い方法で大腸内に存在している *F. nucleatum* に介入できる可能性を示している。従って *F. nucleatum* の正常大腸粘膜や前癌病変における役割を解明することが临床上重要な課題であると考えられる。従来の *F. nucleatum* の大腸癌に関する研究は進行癌の手術標本や癌細胞を用いた実験が主であり、正常粘膜や前癌病変を用いた研究はほとんど行われておらず、実際の人体腸管内における *F. nucleatum* の腫瘍増殖への関与の解明は不十分である。

2. 研究の目的

今回、大腸腫瘍の発育早期における *F. nucleatum* の役割の解明を目的とし、内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) で採取された早期大腸病変 (早期癌や腺腫などの前癌病変) の臨床検体を用いて *F. nucleatum* の存在と発現の解析、マイクロサテライト不安定性 (MSI) や DNA メチル化などのエピジェネティックな分子異常との関連を解析する。

また早期大腸病変の ESD 検体から Laser Capture Microdissection (LCM) を用いて病変周囲の正常粘膜を採取することができ、より健常に近い正常粘膜をサンプルとして多数例用いることができる。この手法により正常粘膜や小さな大腸腫瘍からの発癌を分子異常の観点から分類することが可能となり、*F. nucleatum* により関連性の強い、リスクの高い発癌経路を同定することが期待でき、これはサーベイランスと予防医学への応用も期待できる。

更には様々な動物モデルでの *F. nucleatum* の増殖、発癌を抑制する方法が発見できれば、ヒトを対象としたコホート研究での食餌内容に関する新たな調査項目の追加と解析、そして高食物繊維食や Probiotics の経口摂取による短期的、長期的な *F. nucleatum* の増殖抑制・発がん抑制効果の研究に繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

今回、我々は札幌医科大学付属病院と関連施設で内視鏡的・外科的に切除された 1000 症例をこえる大腸癌を対象とした。それらの臨床検体 (FFPE 標本) を用いて Real-time PCR による *F. nucleatum* の解析を行った。さらに *F. nucleatum* に関しては生命予後や他の臨床病理学的因子、分子異常 (遺伝子変異や DNA メチル化の異常、microRNA 発現等)、T 細胞リンパ球の腫瘍組織内浸潤との関連について検討した。

また LCM を用いて大腸腺腫や早期大腸癌などの発癌早期の病変における *F. nucleatum* の発現量を正常粘膜と比較して検討した。

さらに Apc 遺伝子に変異を持つ ApcMin マウスを使用し、*F. nucleatum* を食餌として与えることにより腫瘍の発生 (個数、サイズ、浸潤) に関して評価を行い、食物繊維量、Probiotics の併用による *F. nucleatum* と腸内細菌叢の変化、腫瘍発生頻度の変化を検討する。

4. 研究成果

我々は *F. nucleatum* と MSI status、T 細胞リンパ球の腫瘍組織内浸潤との関連について多症例の大腸癌臨床検体を用いた検討を行った。対象は日本人 (511 例) と米国白人 (598 例) の大腸癌 1109 症例で *F. nucleatum* の発現を解析し、臨床病理学的因子に加え、ゲノム・エピゲノム異常との相関についても検討。また Image analyzer を用いて腫瘍組織内へ浸潤した特異的なリンパ球 (CD3+, CD8+, CD45RO+, FOXP3+ T 細胞) の密度を自動カウントし、*F. nucleatum* との関連についても解析を行った。その結果、大腸癌症例の 13% (米国人)、9% (日本人) で *F. nucleatum* は陽性であった。MSI 陽性は米国人大腸癌の 16%、日本人大腸癌の 8% で認めら

れた (図 1)。

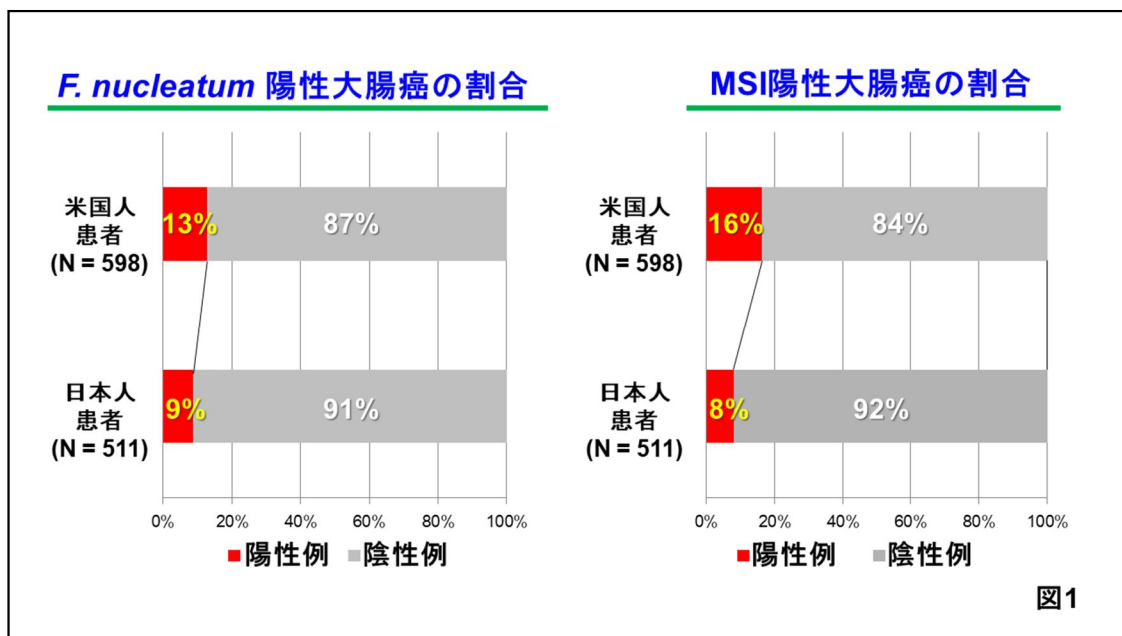


図1

また人種に関わらず *F. nucleatum* 陽性例は MSI 陽性と有意な正の相関を認めた。臨床病理学的・分子生物学的因子を変数として加えた多変量解析では *F. nucleatum* 陽性大腸癌の群は陰性群と比較して腫瘍組織内の CD3+T 細胞の密度が有意に少ないことも明らかとなった。

これまでの検討でも日本人の MSI 陽性大腸癌の頻度が欧米人よりも低いとの報告が多いが、これらの解析結果は人種や地域差による大腸癌組織内の *F. nucleatum* 陽性率や発現量の違いが MSI 陽性の頻度に影響を与えている可能性も示唆している。よって人種や地域差に関わらず腸内の常在微生物である *F. nucleatum* とマイクロサテライト不安定性との間に有意な相関がみられたことは散発性の MSI 陽性大腸癌の発生メカニズムを明らかにする上で興味深い研究成果であると思われる。

LCM を用いた解析では *F. nucleatum* は正常大腸粘膜と比較して SSA/P や通常腺腫のような大腸前癌病変、また早期大腸癌の腫瘍部で発現亢進がみられた。一方、腺腫内癌症例では低異形度腺腫部と高い異形度腺腫部や癌部と比較したが、それらの発現レベルに有意差はみられなかった。

また *Apc* 遺伝子に変異を持つ *ApcMin* マウスを使用し、*F. nucleatum* を食餌として与えることにより腫瘍の発生 (個数、サイズ、浸潤) に関する評価は現在、解析中であり、その研究成果が待たれるところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Eto Tsugio, Miyake Keisuke, Shinichi Kanno, et al. | 4. 巻 245 |
| 2. 論文標題 Impact of loss-of-function mutations at the RNF43 locus on colorectal cancer development and progression | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Pathology | 6. 最初と最後の頁 445 ~ 455 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5098 | 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 能正勝彦、菅野伸一、仲瀬裕志 | 4. 巻 264 |
| 2. 論文標題 大腸発癌と腸内細菌 Serrated pathwayとのかかわり | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 医学のあゆみ | 6. 最初と最後の頁 71 ~ 75 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| 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 Ishigami Keisuke, Noshio Katsuhiko, Koide Hideyuki, Kanno Shinichi, Mitsunashi Kei, Igarashi Hisayoshi, Shitani Masahiro, Motoya Masayo, Kimura Yasutoshi, Hasegawa Tadashi, Kaneto Hiroyuki, Takemasa Ichiro, Suzuki Hiromu, Nakase Hiroshi | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 MicroRNA-31 reflects IL-6 expression in cancer tissue and is related with poor prognosis in bile duct cancer | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Carcinogenesis | 6. 最初と最後の頁 1127 ~ 1134 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgy075 | 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 能正勝彦、菅野伸一、仲瀬裕志 | 4. 巻 375 |
| 2. 論文標題 Fusobacterium - Serrated pathwayとの切り口から | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 消化器・肝臓内科 | 6. 最初と最後の頁 371 ~ 381 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| 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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 能正勝彦、菅野伸一、仲瀬裕志 |
| 2. 発表標題 食と大腸がん：（Fusobacterium・腫瘍免疫応答との関連から） |
| 3. 学会等名 JDDW2019（招待講演） |
| 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 |
|-------|--|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 能正 勝彦 (NOSHO KATSUHIKO) (10597339) | | |