

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07779

研究課題名（和文）大腸癌の高度危険度群マウスにおけるFusobacteriumの役割

研究課題名（英文）The Role of Fusobacterium in High-Risk Mice for Colorectal Cancer

研究代表者

鈴木 興秀（Suzuki, Okihide）

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：90726324

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年、腫瘍組織には特有の細菌叢が存在することが明らかとなった。口腔内常在菌Fusobacterium nucleatum (F. nucleatum)は大腸癌組織から高頻度に検出され、癌促進因子として働くことが示唆されている。本研究では、哺乳類細胞とF. nucleatumの相互作用を観察するための最適条件を模索した。その条件下での観察において、F. nucleatumは、感受性細胞に上皮-間葉移行を想起させる変化を惹起することが明らかとなった。上皮-間葉移行は癌病態進展に強く関わることから、F. nucleatumの宿主体内動態のコントロールは、がんの進展抑制となりうると思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、哺乳類細胞の形質変化の観察に実用的なF. nucleatum-哺乳類細胞共培養系を構築した。それによりF. nucleatumによって引き起こされる上皮-間葉移行などの特徴的な宿主細胞の変化を見出した。以上より、F. nucleatumの宿主体内動態のコントロールは、がんの進展抑制となりうることから、従来からの標準的ながん治療とF. nucleatumを標的とした方策を組み合わせることによって、がん医療の大きな改善をもたらすことが期待される。

研究成果の概要（英文）：In recent years, it has become clear that tumor tissues contain a specific bacterial flora; Fusobacterium nucleatum (F. nucleatum), an oral resident bacterium, is frequently detected in colorectal cancer tissues, suggesting that it acts as a cancer-promoting factor. In this study, the optimal conditions for observing the interaction of F. nucleatum with mammalian cells were explored. The results showed that F. nucleatum induces gene and protein expression changes in susceptible cells that are reminiscent of epithelial-mesenchymal transition. Since the epithelial-mesenchymal transition is strongly associated with the progression of cancer pathology, controlling the behavior of F. nucleatum in the host body may inhibit cancer progression.

研究分野：がん治療

キーワード：Fusobacterium nucleatum 細菌叢 がん

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト大腸における複雑な細菌生態系は健康維持と疾病発症に重要な役割を担っている。特に宿主大腸とその細菌叢の間にある健全な共生関係の破綻は、宿主に慢性的な代謝異常や炎症性変化をもたらす。近年、宿主腸内細菌叢の研究から判明した重要な所見は、Gram 陰性で嫌気性の口腔内常在細菌 *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) が、進展した大腸癌組織から高頻度に検出される点にある (Hussan H, et al. World J Gastroenterol 2017)。実際、大腸腺腫モデルマウスを用いた実験的研究では、*F. nucleatum* の消化管腺腫深部への集積と腫瘍増大を促進することが示され、*F. nucleatum* が大腸癌進展因子として働くことが示唆されている (Kostic AD, et al. Cell Host Microbe 2013; Rubinstein MR, et al. Cell Host Microbe 2013; Bullman, et al. Science 2017)。さらに *F. nucleatum* の腫瘍内感染が担がん宿主免疫応答を変化させ (Gur C, et al. Immunity 2015; Saito T, et al. Nat Med 2016)、抗がん化学療法に対する治療抵抗性の要因になっていることが示唆されている (Yu T, et al. Cell 2017)。

### 2. 研究の目的

上述のように、ヒト臨床検体を用いて *F. nucleatum* と癌の進展の関係を示唆する所見は蓄積されているものの、癌の進展に嫌気性細菌 *F. nucleatum* 感染はどのように関わっているのか、その詳細なメカニズムは明らかではない。本研究では、マウスモデルを用いて、*F. nucleatum* (標準株) を介した腫瘍進展機構について分子・細胞レベルでの解明を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 腸管腫瘍発生モデルマウスの構築

*F. nucleatum* 接種による癌進展効果を評価するため、腸管腫瘍発生遺伝子改変マウスの構築に取り組んだ。米国 Jackson 研究所から *MSH2*<sup>loxP/loxP</sup> マウスと *Villin-Cre* マウスの繁殖ペアを入手し、指定実験施設にて自家繁殖を行なった。離乳マウスの尾を検体として DNA を抽出し、PCR 法で遺伝型解析を行なった。その結果に基づき、交配を重ねてそれぞれの系統の遺伝子ホモ個体を得た。それぞれの系統のホモ個体を交配することで腸管特異的にミスマッチ修復遺伝子異常をもつ *Msh2*<sup>loxP/loxP</sup> *Villin-Cre* マウスを作製することを目指した。*Msh2*<sup>loxP/loxP</sup> *Villin-Cre* マウスは 6 ヶ月で約半数、10 ヶ月ではほぼ全数が腸管腫瘍を発生することが報告されている (Kucherlapati et al. Gastroenterology 2010)。

#### (2) 細菌および細胞と培養方法

*F. nucleatum* は ATCC25586 (#8532) 及び RIKEN# 6328 の 2 株を用いた。これらの細菌株を GAM 培地に接種し、窒素ガスを充満させた嫌気チャンバー内に静置して培養した。継代は週に 2 回の頻度で行い、定期的に Gram 染色・鏡検して菌体の形状を確認した。

細胞は、形質転換実験で実績があるマウス乳腺上皮細胞 NMuMG を用いた。

#### (3) *F. nucleatum* とマウス NMuMG 細胞の共培養と各種表現形の評価

*F. nucleatum* を培養した菌体浮遊液を、一定の菌体密度に調整した。菌体密度の調整には OD600 の吸光度を利用した。調整した菌体浮遊液を NMuMG 細胞に乳腺上皮接種し、一定時間共培養後、NMuMG 細胞の形態、遺伝子発現、タンパク質発現について評価した。

### 4. 研究成果

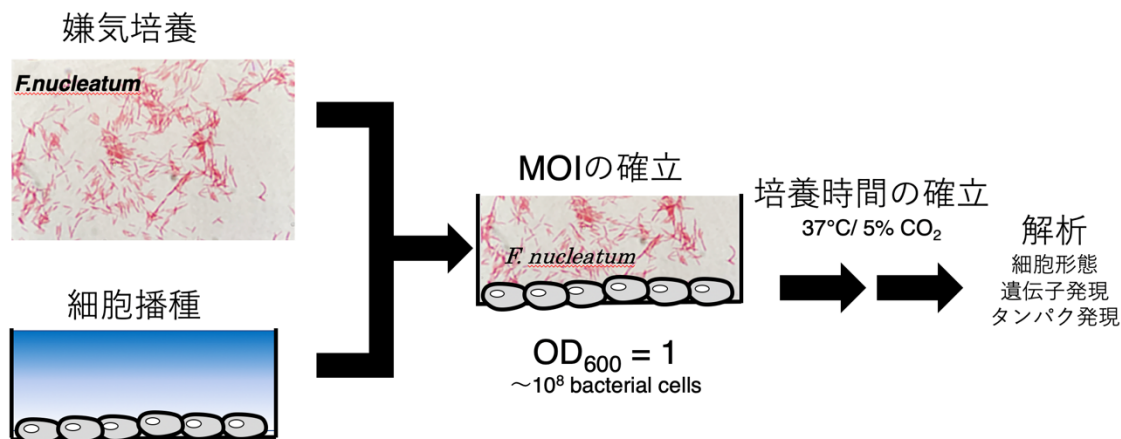
#### (1) 腸管腫瘍発生モデルマウスの構築

米国 Jackson 研究所から *MSH2*<sup>loxP/loxP</sup> マウスと *Villin-Cre* マウスの繁殖ペアを入手、自家繁殖し、当該遺伝子をホモにもつ個体を作製した。これらホモ個体を繁殖したところ *MSH2*<sup>loxP/loxP</sup> マウスで親マウスによる新生仔マウスの食殺が頻発し、腸管腫瘍発生モデルマウスの構築に十分なホモ個体の確保ができなかった。このマウス繁殖のトラブルが研究遂行の律速条件となり、研究遂行に大幅な遅れが生じた。

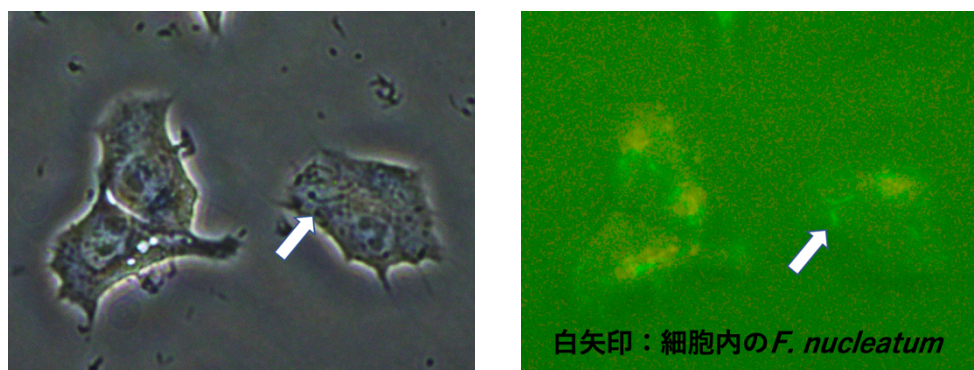
#### (2) *F. nucleatum* 哺乳類細胞の共培養系の構築

*In vivo* 腫瘍モデルの作製が難航したため、*in vitro* での細菌・哺乳類細胞共培養による実験系の構築に取り組んだ。*F. nucleatum* に運動性がないことから、細菌・細胞間の接着が重要視されてきた。また長期間の *F. nucleatum* との共培養実験は環境悪化により哺乳類培養細胞が生存できないことが加わり、これまでのほとんどの研究報告では共培養は 2 日以内のものであった。しかし、実際の生体内細菌叢では、細菌と哺乳類細胞の接触は長きにわたるものである。本研究では培地を適宜交換・調整しつつ共培養を行うことで、長期間培養可能な共培養系を構築した。マウス乳腺細胞株 NMuMG の培養系に *F. nucleatum* を様々な菌量で接種し、経時的に観察して、再現性よく細胞の変化を観察できる多重感染度 (Multiplicity of Infection: MOI) 条件と共培

養時間のシステムを確立した。この培養条件下では、細胞形態は上皮細胞に特有な敷石状の形態から紡錘形に変化した。この形態変化から、*F. nucleatum* は上皮細胞の上皮-間葉移行 (epithelial-to-mesenchymal transition: EMT) を促すことが推察された。



*F. nucleatum* の菌体を蛍光色素 CFSE を用いて染色し、哺乳類細胞と共培養したところ、一部の菌体は哺乳類細胞の細胞内に取り込まれることが判明した。この結果より、培地の交換・調節によっても、哺乳類細胞への *F. nucleatum* の影響は失われまいと考えられた。



### (3) 共培養後の哺乳類細胞の各種表現形の検討

上述の方法で *F. nucleatum* と共培養した NMuMG 細胞から RNA を抽出し、RNA シーケンスによるトランスクリプトーム解析を行なった。単独で培養した NMuMG 細胞と *F. nucleatum* と共培養した NMuMG 細胞の間で 764 遺伝子の発現に差異があり、*F. nucleatum* 共培養によって発現量が増加したものは 441 遺伝子、発現量が減少したものは 323 遺伝子であった。発現が増加した遺伝子には、細菌感染で増加することが知られている遺伝子群も含まれていたことから、解析結果は信頼できるものと判断した。

共培養時の細胞形態から、上皮-間葉移行 (EMT) が生じていることが推察されたため、EMT に関連する遺伝子の発現について評価した。その結果、単独培養細胞と比較して、上皮細胞のマーカー遺伝子は共培養細胞では減少し、間葉系マーカー遺伝子の発現は増加していた。以上の結果ふまえて、主な EMT マーカーについて免疫染色法およびウエスタンブロット法により評価した。その結果、*F. nucleatum* との共培養によって、E-カドヘリンの減少と  $\alpha$ SMA や転写因子 Slug の増加を認め、トランスクリプトーム解析での EMT マーカーの挙動と同様の変化がタンパク質レベルでも確認できた。今回の結果から、*F. nucleatum* は上皮細胞の EMT を促進することが明らかとなった。EMT はがんの浸潤や転移に必須の要素であることから、腫瘍組織内に *F. nucleatum* が定着することは腫瘍病態の増悪因子と考えることができる。以上より、本研究成果は口腔内常在菌 *F. nucleatum* の宿主体内動態のコントロールが、発がん予防やがんの進展抑制となりうることを示唆している。

今後は *F. nucleatum* が如何に腫瘍病態を進展させるか、さらには発がんへの関与も含めてより詳細な分子メカニズムを明らかにすべく研究を発展させるとともに、生体内での *F. nucleatum* と宿主細胞の相互作用の解析を可能とする動物モデルの構築を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村彰宏、堀内 大、鈴木興秀、吉田明弘、村上 孝。
2. 発表標題 嫌気性細菌Fusobacterium nucleatumはマウスNMuMg乳がん細胞株のEMT化を促進する。
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 akamura A, Horiuchi Y, Inchikawa T, Suzuki O, Yoshida A, Murakami T.
2. 発表標題 Fusobacterium nucleatum promotes epithelial-mesenchymal transition in murine NMuMG breast cancer cells.
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2023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	堀内 大  (Horiuchi Yutaka)  (30608906)	埼玉医科大学医学部・微生物学・講師    (32409)	

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