

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08839

研究課題名(和文) がん化学療法後の全身性免疫炎症病態へのFusobacteriumの役割の解明

研究課題名(英文) Roles of Fusobacterium nucleatum in Systemic Inflammations by Cancer Chemotherapy

研究代表者

中村 信元 (NAKAMURA, Shingen)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・特任准教授

研究者番号：10511321

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)：基礎的検討として、口腔内上皮細胞株TR146にmelphalanなどの抗癌剤を添加するとROSの産生が亢進するがFusobacterium nucleatum(Fuso)を加えるとさらに亢進した。血液培養ボトルからのFusoのPCRでの検出や、血清や唾液中の抗Fuso抗体をELISA法での検出を試みたが感度や非特異反応などにより困難だった。臨床的検討として患者での唾液と舌苔を採取したところ、唾液中IgAが低い、舌苔中のFusoが多い、舌苔の真菌叢の多様性の低さなどが化学療法後のFN発生と関連する傾向がみられた。今後の臨床検査や治療応用のために抗Fusoモノクローナル抗体を作成中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Fusobacterium nucleatumは口腔内の嫌気性菌の一種として知られ、歯周病や大腸がんに関与している。しかし、全身化学療法によるそれらの細菌の影響などはほとんど検討されていない。Fusobacteriumの検出のための基礎検討や患者での口腔内環境と発熱性好中球減少症との関連を調査した。今後の治療応用を視野に入れた抗Fusobacterium抗体の作成などを行っており、今後の歯周病や大腸がん、がん化学療法の支持療法の進歩に対して意義ある研究と考える。

研究成果の概要(英文)：ROS production was enhanced when anticancer drugs such as melphalan were added to the oral epithelial cell line TR146, and it was further enhanced when Fusobacterium nucleatum (Fuso) was added. We attempted to detect Fuso from blood culture bottles by PCR and anti-Fuso antibodies in serum and saliva by ELISA (using plates coated with Fuso), but it was difficult to measure accurately due to sensitivity and nonspecific reactions. As a clinical study, we collected saliva and tongue coating before chemotherapy in patients with hematologic diseases to examine the association with febrile neutropenia, and found that low IgA in saliva and high F. nucleatum, low diversity in fungal microbiota in the tongue coating were associated with the occurrence of febrile neutropenia. An anti-Fuso monoclonal antibody is being prepared for future detection and therapeutic application against Fuso.

研究分野：Infectious disease during cancer chemotherapy

キーワード：Fusobacterium nucleatum secretory IgA

1. 研究開始当初の背景

ヒトの体内では、口腔内と大腸に最も細菌が多く、口腔内では 500 種類以上、1010-1011/g の細菌が存在するとされ、それらの多くは嫌気性菌が占める (J Bacteriol. 192(19):5002-17,2010.)。嫌気性菌のほとんどは培養が容易ではなく研究が困難であったが、細菌の遺伝子を 16SrRNA のプロファイルを用いて解析する、網羅的なメタゲノム解析によりその全貌が明らかになりつつある (Database. 2010;2010:baq013.)。近年では、口腔内細菌は歯科疾患や頭頸部癌、肺炎などの解剖学的に近接した部位の疾患のみならず、肥満や動脈硬化、リウマチなどの全身疾患やアルツハイマー病や自閉症などの中枢神経疾患なども関連することが報告されている (Protein Cell. 29(5):488-500,2018.)。しかし、がん自体、がん化学療法、分子標的療法、造血幹細胞移植などにおける口腔内細菌叢の変動やそれがもたらす病態への役割はほとんど解析されていない。我々は、当院歯学部と連携し、各種病態における口腔内細菌叢の変調と口腔内免疫環境、唾液の性状などとの関連に関する研究を行ってきた。まず、ヒトの口腔内細菌叢や唾液中分泌型 IgA (sIgA) が、化学療法中に及ぼす影響について検討した。2013 年 1 月より 2017 年 3 月までに当院血液内科でがん化学療法を受けた患者を対象とし、唾液中 sIgA や舌苔の各種細菌数を real-time PCR で測定し、その後の発熱性好中球減少症 (FN) 発症との関連を分析した。舌苔の細菌と sIgA の両方が解析可能だった 33 例中、8 例に FN が発症し、発症した群では有意に治療前の sIgA が低く (308 vs 639 μ g/ml, $p=0.04$)、舌苔の *Fusobacterium nucleatum* (Fuso) の割合が高い (4.46% vs 1.84%, $p=0.02$) ことがわかった (日本臨床腫瘍学会 2018 で発表)。これらのことから、口腔内の Fuso や sIgA は、直接的あるいは間接的に化学療法中の FN 発症に関与していることが考えられた。

Fuso はグラム陰性偏性嫌気性菌で、口腔内や腸内の常在菌の一つであるが、健常人におけるその割合は多くない。歯周病の炎症性細菌として有名であり、内科領域では Lemierre 症候群の原因菌のひとつとして知られている。近年では大腸癌の組織に *Fusobacterium* が PCR で大量に検出されることが報告され (Genome Res. 22(2):299-306,2012.)、その存在は、大腸癌の予後とも関連し (World J Gastrointest Oncol. 10(3):71-81,2018.)、いわゆる oncogenic bacteria のひとつと考えられはじめている。さらに潰瘍性大腸炎などの炎症性疾患や解剖学的に離れた、膵臓癌とも関連していることも報告されている (Annu Rev Microbiol. 70:395-411,2016.)。

これらのことから、胃に感染し、胃癌や MALT リンパ腫、血小板減少性紫斑病などの原因と判明した *H.pylori* と同様に、Fuso が歯周病のみならず各種病態形成や増悪因子となる可能性が強く示唆され、化学療法や造血幹細胞移植時などでは、口腔内細菌叢や口腔内免疫が破綻し、全身への播種や局所での細胞傷害などから、全身的な影響をもたらすのではないかと考えた。そのため、口腔内細菌、特に Fuso がどのように腫瘍やそれを取り巻く環境で生体に影響を与えているのか、を検討するため以下の研究を行った。

2. 研究の目的

口腔内細菌、特に Fuso の口腔内、腸管内、組織内などにおける簡便な検出法を開発すること、および Fuso の局所および遠隔臓器、全身的な影響の実態を検証することを目的とする。そして、Fuso による感染やその免疫応答が基盤としてもたらされる細胞障害や臓器機能障害、腫瘍に対する影響などの病態の解明に繋げる。

3. 研究の方法

(1) 化学療法または造血幹細胞移植における口腔内細菌叢の役割の解析

これまでに明らかにした、唾液 sIgA 低下、舌苔 Fuso 増加と FN との関連の検討を発展させ、化学療法や造血幹細胞移植の治療前後、広域抗菌薬の使用前後に唾液と舌苔の口腔内細菌を採取して、舌苔の口腔内細菌叢、特に Fuso の量の変化 (real-time PCR 法: 歯学部口腔保健衛生 日野出大輔先生)、sIgA の変化と各種臨床病態との関連を調べる。また、*Fusobacterium* の全身播種の可能性も考え FN 患者においては血液培養の残血を用いた PCR 検査も行う。

(2) Fuso の各種細胞に対する影響の検討 (in vitro) とその機序の解明

Fuso は、大腸癌細胞との共培養で大腸癌の増殖、進展に作用することが報告されている (Gastroenterology 152:851,2017.)。従って、がん化学療法中において腫瘍自体およびその微小環境に負の影響を及ぼす可能性が考えられる。それらを模倣した培養系で、悪性腫瘍やその微小環境細胞に対する Fuso の直接的効果を実証する。

(3) ヒト唾液中あるいは血清中の抗 Fuso 活性・抗体の検出

ヒトの唾液中には sIgA やディフェンシンなどの抗菌物質が含まれているとされる。これまでの検討では、FN 発症患者では治療前の舌苔の Fuso が多かったことから、化学療法中には唾液中の抗菌活性が減弱し、口腔内免疫が破綻している可能性が考えられる。Fuso の検出方法として、現在では PCR 法以外なく、培養した Fuso を用いて whole-cell ELISA 法を用いたヒト血清、唾液中での検出系を確立する。

(4) 抗 Fuso 特異抗体の精製と半定量迅速診断法の開発

現在、Fusobacterium の検出は PCR 法以外の測定方法がない。近年、各種感染症に対するイムノクロマト法を用いた迅速診断が頻用されているが Fuso においても実用化されれば歯科領域でも重要性が高い。抗 Fuso 抗体の大量精製のため、歯学部で培養(歯学部微生物学 村上圭史先生)した Fuso の浮遊液を、超音波破碎あるいはグルタルアルデヒド固定後にアジュバントと共にマウスに腹腔内投与して免疫させ、前述の方法で確立した ELISA 法で抗体価を測定する。抗体価が十分であれば、マウスの脾臓から cell suspension を作成し、PEG 法による SP 2/0 非分泌骨髄腫細胞との細胞融合によりハイブリドーマを作成し、96 穴プレートでコロニー形成を観察しながら特異抗体を産生する細胞をスクリーニングし、サブクローニングを経て抗体精製を目指す。次にその抗 Fuso 特異抗体を用いて、ELISA 法による Fuso の菌数を半定量的に検出できるか試み、最終的にはイムノクロマト法による半定量迅速キットの開発を目標にする。

4. 研究成果

まず基礎的検討として、口腔内上皮細胞株 TR146 に melphalan などの抗癌剤を添加すると ROS の産生が亢進するが Fuso を加えるとさらに亢進した。血液培養ボトルからの Fuso の PCR での検出や、血清や唾液中の抗 Fuso 抗体を ELISA 法での検出を試みたが、感度や非特異反応などにより困難だった。またすでに知られた Fuso 表面抗原でのペプチドを作製し、それらを抗原としたポリクローナル抗体を 6 種類作成したが、特異性が低かった。

臨床的検討として血液疾患での唾液と舌苔を採取して FN との関連を検討したところ、唾液中 IgA が低い、舌苔中の Fuso が多いことが FN 発生と関連する傾向がみられた。また、同時に舌苔の DNA による口腔内真菌叢の解析を行ったところ、唾液中 IgA と口腔内真菌叢の多様性との相関がみられ、口腔内環境と FN における関連が見いだされた。

Fuso は臨床的検出が困難なことや実験系の確立が困難に思われることから今後の臨床検査や治療応用を目指して抗 Fuso モノクローナル特異抗体を現在作成中である。本研究により特異抗体が作製できれば Fuso の化学療法時のヒトへの影響の全貌解明と、より効果的な支持療法、効率的な化学療法の開発に繋がることを期待される。

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
研究分担者	村上 圭史 (MURAKAMI Keiji) (10335804)	川崎医療福祉大学・医療技術学部 臨床栄養学科・教授 (35309)	
研究分担者	日野出 大輔 (HINODE Daisuke) (70189801)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授 (16101)	

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