

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18081

研究課題名（和文）メタゲノミクス解析を用いた大腸癌肝転移巣における細菌叢解析と病理学的意義の解明

研究課題名（英文）Bacterial flora analysis and its pathological significance in liver metastases of colorectal cancer using metagenomics analysis.

研究代表者

森 治樹 (Mori, Haruki)

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：40803945

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）：大腸癌原発巣及び転移性肝腫瘍における細菌の検出とその影響について解析した。糞便5例、原発巣5検体、肝転移巣7検体の計16検体の凍結標本からDNAを抽出し、16S rRNA V3V4領域のアンプリコン解析を行った。LEfSeを用いて解析を行ったところ、原発巣ではFusobacteria, Eubacteriumが優勢であり、糞便中にはFirmicutesやClostrida, bacteroidia, 肝転移巣ではsphingomonadaceae, Rhizobialesが優勢であった。CCK-8の実験によりLachnospiraceaeが大腸癌細胞の増殖に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにマウスモデルにおいて、原発巣だけでなく、転移巣でも腫瘍内細菌が存在することが示されているが、その生物学的意義については未だ明らかではない。これまでの報告でIn situハイブリダイゼーションを用いることで、Fusobacteriumが転移性病変の癌細胞にも存在すること、大腸癌PDXマウスモデルでのメトロニダゾール投与による腫瘍量が減少が知られている。今回の結果において、原発巣、転移巣にそれぞれ特定の菌腫が存在することが示唆された。今後、抗菌薬により細菌感染した腫瘍細胞中の細菌を制御することで、化学療法による抗腫瘍効果を高めるなど臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The detection of bacteria in primary colorectal cancer and metastatic liver tumors and their effects were analyzed. DNA was extracted from 16 frozen specimens (5 fecal samples, 5 primary tumors, and 7 liver metastases), and amplicon analysis of 16S rRNA V3V4 region was performed using LEfSe. The analysis using LEfSe showed that Fusobacteria and Eubacterium were predominant in primary foci, Firmicutes, Clostrida, and bacteroidia in feces, and sphingomonadaceae and Rhizobiales in liver metastases. The experiment suggested that Lachnospiraceae may affect the proliferation of colon cancer cells.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 肝転移 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

大腸の腸管内には様々な細菌が存在するが、中でも Fusobacterium は、大腸癌組織での存在が証明されている細菌種の1つである。Fusobacterium およびこれに関連する細菌種は大腸癌原発巣で apoptosis 経路を介して大腸癌の耐性に関与することが知られている (Cell 2017)。大腸癌の原発巣だけでなく、転移先である肝臓などの遠隔臓器においても Fusobacterium が示唆しており、癌組織内における微生物安定性が示唆される。これまでの報告で In situ ハイブリダイゼーションを用いることで、Fusobacterium が転移性病変の癌細胞にも存在すること (Int. J. Cancer 2017) 大腸癌 PDX マウスモデルでのメトロニダゾール投与による腫瘍量が減少 (Science 2017) が知られている。さらに、膀胱癌においては数種類の細菌が抗癌剤のゲムシタピンを分解し、無効化することが報告されており (Science 2017) 腫瘍に細菌が存在すること、また、細菌により抗がん剤などの抗腫瘍効果を減衰している可能性が考えられている。

肝臓は、大腸癌において最も多い転移臓器である。肝転移など遠隔転移を伴う大腸癌は極めて予後不良であり、対策が必要である。生体内には約 100 兆個の様々な細菌種が存在している。特に大腸では腸内細菌が癌周囲環境の一つとして重要な役割を担っており、apoptosis 経路を介した化学療法に対する耐性に関与することが知られている。これまでにマウスモデルにおいて、原発巣だけでなく、転移巣でも腫瘍内細菌が存在することが示されているが、その生物学的意義については未だ明らかではない。

2. 研究の目的

本研究は大腸癌原発巣及び転移性肝腫瘍における細菌の検出と、生体内における癌の進展、転移など細菌が癌細胞に及ぼす影響について、解析を行う。

3. 研究の方法

肝切除を施行した原発巣が大腸癌の転移性肝癌患者の検体(原発巣、転移巣)を収集し、適宜 DNA を抽出する。QIAamp DNA FFPE tissue を用いて、DNA を抽出し、AMI(Average Nucleotide Identity) を行い、全ゲノム配列の類似度から菌種の同定を行う。また qPCR を用いて、大腸に存在する菌種の特異的 DNA 量について検討する。

臨床検体を用いてパラフィン固定した原発巣(大腸)と転移巣(肝臓)検体から QIAamp DNA FFPE tissue を用いて、核酸を抽出し、16SrRNA シークエンスとメタゲノミクス解析を行うことで、全ゲノム配列の類似度から菌種の同定を行う。

4. 研究成果

我々ははじめに大腸癌原発巣と肝転移での腸内細菌叢の差異を検討するため、大腸癌肝転移の FFPE から DNA を抽出した。16S rRNA V3V4 領域のアンプリコンシークエンスをおこなった。同

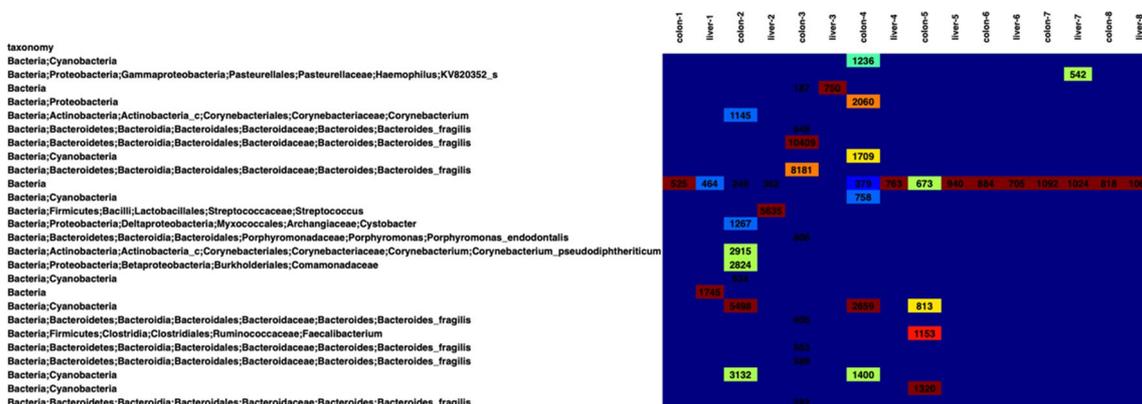


図1 FFPE から抽出した DNA によるアンプリコンシークエンスの結果

時に原発巣からの DNA を抽出し、同様にアンプリコンシーケンスを行った。16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を、混合プライマーセットを用いた PCR によって増幅した。この 16S rRNA 遺伝子を MiSeq シーケンサー (Illumina, CA, USA) を用いてペアエンドシーケンスを行い、Qiime v2.0 パッケージを用いて解析した。FASTX Toolkit splitter の fastq_barcode_ を使用して、配列の読み出し開始がプライマーと完全に一致する配列のみを抽出した。各 OTU の代表的な配列を Silva データベースを

用いて分類し、サンプルごとの OTU の存在比を求めた。(図 1) 解析の結果では Cyanobacteria を多く認めたが、ヒトの細胞内に存在するミトコンドリアも同じ種に属するため、OUT 配列から Blast で確認したところ、ミトコンドリアを検出している可能性が考えられた。肝転移は細菌の量が少なく、相対的にミトコンドリアの量が多いこと、また、FFPE から

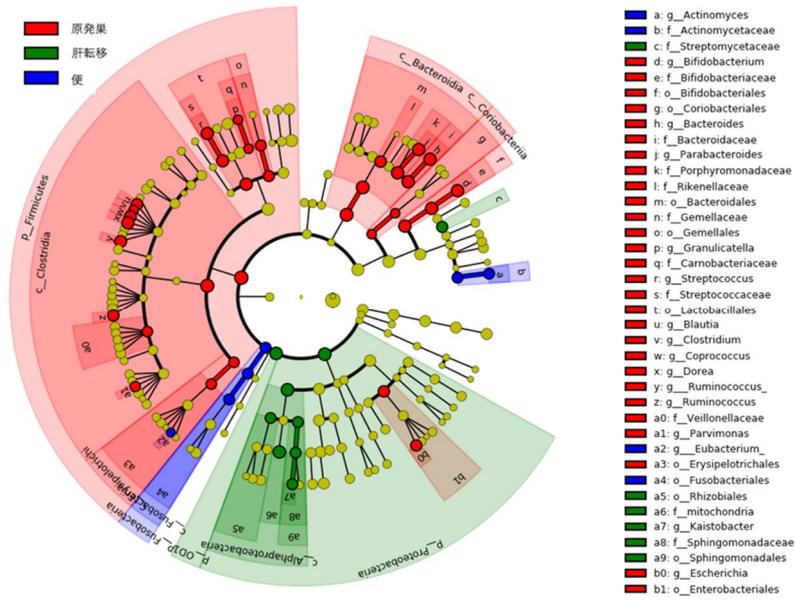


図 2 便と原発巣、肝転移における細菌叢の違い

では品質の良い DNA を多く採取することが難しいことも原因であると考えられた。

そこで、ホルマリン固定後の FFPE からではなく、凍結検体から DNA を採取することとした。糞便 5 例、原発巣 5 検体、肝転移巣 7 検体の計 16 検体の凍結標本から DNA を抽出した。計 16 検体を用いて 16S rRNA V3V4 領域のアンプリコン解析を行った。

線形判別分析 (LDA) 効果量法 (LEfSe) を用いて解析を行ったところ、原発巣では Fusobacteria, Eubacterium が優勢であり、糞便中には Firmicutes や Clostridia, bacteroidia, 肝転移巣では sphingomonadaceae, Rhizobiales が優勢であった。

さらに便が癌細胞に与える影響を検討するため、便の濾過液を用いて癌細胞を刺激し、その増殖能を CCK-8 を用いて検討した。その結果、WiDr の細胞増殖は Lachnospiraceae の割合に応じて抑制され、Lachnospiraceae が大腸癌細胞の増殖に影響を与える可能性が示唆された。今後は Lachnospiraceae が癌細胞に及ぼす機序に注目し、解析を続ける予定である。

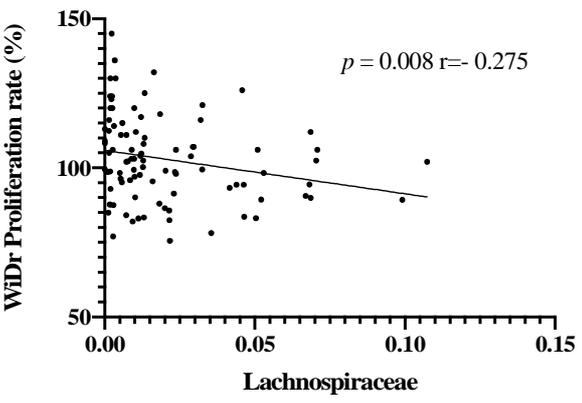


図 2 WiDr の増殖は Lachnospiraceae の割合に応じて抑制された

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Miyake Toru, Mori Haruki, Yasukawa Daiki, Hexun Zhang, Maehira Hiromitsu, Ueki Tomoyuki, Kojima Masatsugu, Kaida Sachiko, Iida Hiroya, Shimizu Tomoharu, Ohno Masashi, Andoh Akira, Tani Masaji	4. 巻 62
2. 論文標題 The Comparison of Fecal Microbiota in Left-Side and Right-Side Human Colorectal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Surgical Research	6. 最初と最後の頁 248 ~ 254
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000516922	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
---------	---------