

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08714

研究課題名(和文) FusobacteriumによるNOD/NF- $\kappa$ Bを介した食道癌進展機序の解明研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of esophageal cancer progression via NOD/NF- $\kappa$ B by Fusobacterium

研究代表者

野元 大地 (NOMOTO, Daichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員

研究者番号：70895408

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)：食道癌細胞株をF. nucleatumと共培養すると、癌細胞の増殖能、浸潤能、遊走能が亢進した。また、F. nucleatumと共培養した食道癌細胞株においてNOD1、リン酸化NF- $\kappa$ Bの発現が上昇した。NOD1もしくはNF- $\kappa$ Bをノックダウンした食道癌細胞株とF. nucleatumを共培養すると、癌細胞株の増殖能亢進は認められなかった。Xenograft mouse modelにおいても、F. nucleatumを投与した腫瘍においてNF- $\kappa$ B活性化と増殖能亢進を確認した。F. nucleatumは食道癌細胞株においてNOD1/NF- $\kappa$ B経路を活性化し、食道癌細胞株の増殖能を亢進させる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Fusobacterium nucleatumが腫瘍進展に影響していることが分かったことから、Fusobacterium nucleatum感染を指標とした食道扁平上皮癌の新たな予後予測バイオマーカーの開発につなげたいと考えている。また、Fusobacterium nucleatumを抗菌薬、Prebiotics、Probioticsなどの薬物を通して抑制することで、Fusobacterium nucleatumをターゲットとした食道扁平上皮癌に対する新たな創薬シーズの開発にもつながるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：F. nucleatum-treated Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells demonstrated enhanced growth, invasion, migration ability, and NF- $\kappa$ B activation, as well as overexpression of NOD1 and phosphorylated (phospho-) RIPK2, compared to controls. siRNA-mediated NF- $\kappa$ B or NOD1 knockdown inhibited the growth of F. nucleatum. Furthermore, treated cells showed accelerated tumor growth and an increased tumor weight, with NF- $\kappa$ B activation in xenograft models. F. nucleatum invaded ESCC cells and induced the NF- $\kappa$ B pathway through the NOD1/RIPK2 pathway, leading to tumor progression.

研究分野：Esophageal cancer

キーワード：Fusobacterium nucleatum Esophageal cancer squamous cell carcinoma NOD NF- $\kappa$ B

### 1. 研究開始当初の背景

食道癌は化学療法、放射線療法、手術療法を組み合わせた集学的治療の進歩にも関わらず、5年相対生存率は未だ40%未満で予後不良である。そのため、新たな早期発見・予後予測のバイオマーカーや新たな治療法開発が望まれている。さらに食道癌は、日本では90%が扁平上皮癌であるのに対し、欧米では70%が腺癌と、組織型が全く異なっており、食道扁平上皮癌に対する基礎・臨床研究は我々日本が中心となって進めていく必要がある。

Microbiome は、近年、癌、肥満、炎症性腸疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患、動脈硬化、自閉症、パーキンソン病など様々な疾患との関連が報告され、注目を集めている先端性の高い分野である。

*Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) はヒトの口腔内、腸管内に存在する細菌の一種で、以前から歯周病の原因菌として知られてきた。しかし近年、*F. nucleatum* が大腸癌切除組織において正常大腸上皮組織に比べ多く生息し、大腸癌の発癌・浸潤、さらには抗癌剤耐性へ関与することが示されている。当科は、325例の食道扁平上皮癌切除症例の解析を行い、正常食道上皮と比較して食道癌組織において、*F. nucleatum* のDNA発現が有意に高いこと、さらに、*F. nucleatum* 陽性症例では陰性症例と比較して有意に予後が不良であることを報告した(Yamamura K et al. Clin Cancer Res. 2016)。さらに、in vitro (*F. nucleatum* と癌細胞の共培養実験) で、*F. nucleatum* が癌細胞株内に侵入するというユニークな現象を確認している(Liu Y, Nomoto D et al. Br J Cancer 2020)。

しかし、*F. nucleatum* が食道癌進展に関わる具体的な分子メカニズムについてはまだ明らかになっておらず、そのメカニズムについて理解が進めば、*F. nucleatum* が食道癌に対する新たなバイオマーカーになる。さらに *F. nucleatum* 感染は抗菌薬やプレバイオティクス、プロバイオティクスなどの薬剤投与によって後天的にコントロールできる可能性が高く、*F. nucleatum* を標的とした創薬シーズ開発につなげたいと考えている。

*F. nucleatum* が腫瘍進展に関わるメカニズムについては、細胞表面レセプターをターゲットとした研究がほとんどである中で、申請者らは *F. nucleatum* が細胞内に侵入するユニークな性質に着目し、細胞内レセプターである NOD-like receptor をターゲットとした研究を行うこととした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、*F. nucleatum* が食道扁平上皮癌進展に関わる分子メカニズムを、細胞内レセプターである NOD-like receptor を介した NF- $\kappa$ B の活性化という観点から明らかにすることである。

近年、microbiome と癌を含めた様々な全身疾患との密接な関連が次々に報告されており、microbiome は後天的に変化させることが可能であることから、この研究成果は translational research として臨床に直結する意義のあるものになると考える。

### 3. 研究の方法

#### 食道癌臨床検体を用いた実験

*F. nucleatum* による食道扁平上皮癌組織での NOD 発現および NF- $\kappa$ B 活性化を評価するため、食道癌切除検体(当科において食道癌に対して外科的切除を行って得られた検体)を用いて免疫組織化学染色を行う。

#### In vitro における共培養実験

NF- $\kappa$ B 遺伝子をノックダウンしたヒト食道癌細胞株を *F. nucleatum* と共培養した上で、機能解析を行い、癌細胞の増殖能・浸潤能・遊走能の変化を確認する。

*F. nucleatum* 共培養下でのヒト食道癌細胞における受容体 NOD のタンパクおよび mRNA レベルでの経時的な発現変化を Western blot, real-time PCR を用いて評価する。NOD 遺伝子をノックダウンした食道癌細胞株を *F. nucleatum* と共培養することで、ヒト食道癌細胞における NF- $\kappa$ B の活性化が阻害されるかどうか、Western blot および蛍光免疫染色で評価する。さらに、食道癌細胞の増殖能・浸潤能・遊走能の変化についても評価する。

#### In vivo モデルにおける検証

In vitro での共培養実験で得られた結果について、生体内での検証を行うため、ヒト食道癌細胞株と *F. nucleatum* をヌードマウスに皮下移植する Xenograft model を作成し、腫瘍増殖能の変化、および腫瘍における NF- $\kappa$ B 活性化や NOD 発現について確認を行う。

#### 4. 研究成果

##### 食道癌臨床検体を用いた実験

食道扁平上皮癌切除検体を用いた免疫染色において、*F. nucleatum* 陽性症例で陰性症例と比較しリン酸化 NF-κB 蛋白発現率が有意に高く、*F. nucleatum* 陽性症例での NF-κB 活性化が示唆された。また、臨床での食道癌切除検体を用いて *F. nucleatum* 陽性症例と陰性症例での臨床病理学的因子の違いを解析すると、腫瘍の深達度、リンパ節転移が *F. nucleatum* 陽性症例で有意に進行していた。

##### *In vitro* における共培養実験

ヒト食道癌細胞株と *F. nucleatum* を共培養すると、食道癌細胞の増殖、浸潤、遊走能が亢進し、食道癌細胞株におけるリン酸化 NF-κB タンパク発現が増加した。

NF-κB 遺伝子をノックダウンしたヒト食道癌細胞株を *F. nucleatum* と共培養した上で、機能解析を行い、癌細胞の増殖能の変化を確認したところ、*F. nucleatum* による癌細胞の増殖能亢進効果が抑制され、*F. nucleatum* が NF-κB 活性化を介して癌細胞増殖能を亢進させていることが示唆された。

##### *In vivo* モデルにおける検証

*In vitro* での共培養実験で得られた結果について、生体内での検証を行うため、ヒト食道癌細胞株と *F. nucleatum* をヌードマウスに皮下移植する Xenograft model を作成し、腫瘍増殖能の変化、および腫瘍における NF-κB 活性化や NOD 発現について確認を行った。癌細胞株単独移植群と、癌細胞株と *F. nucleatum* の同時移植群を比較すると、同時移植群で腫瘍増殖能は有意に高く、NF-κB や NOD の発現も上昇していた。

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 Nomoto Daichi, Baba Yoshifumi, Liu Yang, Tsutsuki Hiroyasu, Okadome Kazuo, Harada Kazuto, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Iwagami Shiro, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Watanabe Masayuki, Moroishi Toshiro, Komohara Yoshihiro, Sawa Tomohiro, Baba Hideo	4. 巻 530
2. 論文標題 Fusobacterium nucleatum promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via the NOD1/RIPK2/NF- B pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 59 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2022.01.014	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野元 大地、馬場 祥史、森永 剛司、秋山 貴彦、岡留 一雄、山下 晃平、坂本 悠樹、大徳 暢哉、問端 輔、中村 健一、小川 克大、澤山 浩、岩槻 政晃、石本 崇胤、岩上 志朗、宮本 裕士、吉田 直矢、馬場 秀夫
2. 発表標題 Fusobacterium nucleatumはNF-kB経路を介し食道癌進展に関する
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021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	馬場 祥史  (BABA yoshifumi)  (20599708)	熊本大学・病院・特任准教授   (17401)	
研究分担者	岩槻 政晃  (IWATSUKI Masaaki)  (50452777)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教   (17401)	

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