

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19680

研究課題名（和文）大腸発がんにおける食事・腸内細菌叢・代謝物の複合作用の解明を目指した疫学研究

研究課題名（英文）Epidemiological research for elucidating the combined effects of diet, gut microbiota, and metabolites on colorectal carcinogenesis

研究代表者

岩崎 基（Iwasaki, Motoki）

国立研究開発法人国立がん研究センター・がん対策研究所・部長

研究者番号：60392338

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：食事因子・腸内細菌・代謝物の複合作用が想定される代表例として、肉類・脂肪酸摂取、一次胆汁酸と腸内細菌の代謝による二次胆汁酸に着目した解析を実施した。肉類および飽和脂肪酸の摂取量と大腸腫瘍リスクとの間に有意な関連は認めなかったが、腸内細菌の解析ではRomboutsiaの存在量が症例群で有意に高かった。また検診前に収集した血漿検体（303検体）を用いて網羅的なメタボローム解析を実施し、14種の胆汁酸代謝物濃度を取得した。大腸腫瘍リスクとの関連では、抱合型一次胆汁酸であるGlycocholic acidとの間に正の関連が示唆されたが、二次胆汁酸を含め他の胆汁酸代謝物の間には関連を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人を対象として食事因子・腸内細菌・代謝物の複合作用が検討可能な疫学研究基盤は非常に限られている中で、既存のアンケート情報から食品・栄養素摂取量の評価、便検体由来DNAを用いた16S rRNA解析による腸内細菌叢データの整備、さらに一部の対象者の血漿検体を用いて新規に代謝物濃度の測定を実施し、大腸腫瘍リスクとの関連が検討できる研究基盤が構築された点は、当該分野の研究推進の面で貢献は大きい。さらに代謝物濃度の測定を行う対象者を増やし、食事因子・腸内細菌・代謝物の複合作用の検討を進めて行くことが期待される。

研究成果の概要（英文）：As a representative example where the combined effects of diet, gut microbiota, and metabolites are hypothesized, we conducted an epidemiological research focusing on meat and fatty acid intake, primary bile acids, and secondary bile acids produced by gut microbiota metabolism. The results showed no significant association between the intake of red meats and saturated fatty acids and the risk of colorectal tumors. However, the analysis of gut microbiota revealed that the abundance of Romboutsia was significantly higher in the case group. Additionally, in this study, a comprehensive metabolomic analysis was performed using plasma 303 samples collected prior to cancer screening, obtaining the concentrations of 14 types of bile acid metabolites. Regarding the association with colorectal tumor risk, a positive association was suggested with glycocholic acid, a conjugated primary bile acid, but no associations were found with other bile acid metabolites, including secondary bile acids.

研究分野：がんの疫学

キーワード：大腸 腸内細菌叢 代謝物 食事因子 疫学研究

### 1. 研究開始当初の背景

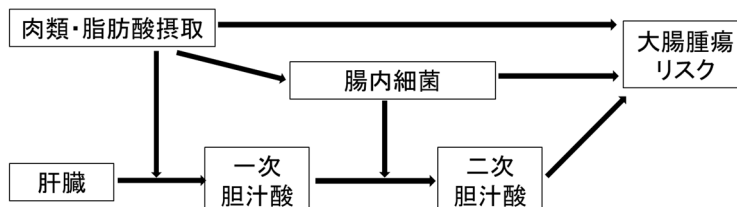
孤発性のがんは典型的な多因子疾患であり、環境因子の寄与が大きく、遺伝素因は小さいものの、複数の環境因子と遺伝素因が複雑に影響し合い発がんに至ることから、いわゆる遺伝環境交互作用の検討は重要なテーマである。遺伝環境交互作用では、環境因子曝露に対する発がん感受性の修飾因子として、その環境因子の代謝などに関与する遺伝子多型に着目してきた。一方、近年の解析技術の進歩に伴う腸内細菌叢に関するエビデンスの蓄積により、がんのリスク因子の中にも腸内細菌により宿主の様々な生理状態に影響することが示されてきたことから、それらの腸内細菌やその代謝物も発がん感受性の修飾因子になり得るのではないかと考えるに至った。

赤肉や食物繊維は大腸がんのリスク因子として知られているが、大腸発がんへの影響として、腸内細菌により産生される代謝物を介した作用が指摘されている。これは、例えば赤肉の摂取量が少ない人でも、腸内細菌や代謝物の状態によっては大腸がんのリスク上昇が観察される、あるいは摂取量が多い人でもリスク上昇がみられない可能性があることを示唆している。しかしながら、食事因子と大腸腫瘍との関連を検討する際に、腸内細菌や代謝物による効果の修飾を想定し、食事因子・腸内細菌・代謝物の複合的作用を明らかにする試みはほとんどなされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、無症状の住民を対象に大腸内視鏡検診を実施した大島研究において、検診前に収集した生活習慣・食事に関するアンケート調査結果、便および血漿検体の分析結果を用いて、食事因子・腸内細菌・代謝物と大腸腫瘍リスクとの関連を複合的作用の観点から検討する事を目的とする。

特に食事因子・腸内細菌・代謝物の複合的作用が想定される代表例として、本研究では肉類・脂肪酸摂取、一次胆汁酸と腸内細菌の代謝による二次胆汁酸に着目した解析を行う。これらの想定される関係を図に示す。赤肉などの肉類の過剰摂取および肉類に多く含まれる飽和脂肪酸などの過剰摂取により一次胆汁酸の産生が増加し、さらに腸内細菌による二次胆汁酸への代謝が亢進することにより発がんに関与することが指摘されている。また肉類摂取によるリスク上昇の背景には、腸内細菌を介さない作用も想定され、さらに二次胆汁酸の代謝に関与しない腸内細菌の発がんへの関与も想定される。後者の中には腸内細菌の代謝物であるトリメチルアミンや硫化水素などがあるが、以前より基礎研究等で DNA 損傷などによる発がん作用が指摘されている胆汁酸を主な対象とする。また糞便中二次胆汁酸濃度と大腸腫瘍との関連におけるメタアナリシスでは有意な関連が報告されていないが (Yonsei Med J. 2008;49:792-803.) 血中濃度を測定した近年の研究では有意な正の関連が観察されている (J Natl Cancer Inst. 2020;112:516-524.) 本研究ではこのような関係を考慮し、肉類・脂肪酸摂取、腸内細菌、血漿中胆汁酸濃度の複合的な作用を検討する。



### 3. 研究の方法

#### 【対象集団】

大島研究は、東京都大島町在住の 40-79 歳の住民に大腸内視鏡検診を提供し、新規診断バイオ

マーカーを探索・検証することを目的とした研究である。2015-2017年の3年間に1367人が参加し、検診実施前に食物摂取頻度調査票を含むアンケート調査、便および血漿検体の収集を行い、検診後の精密検査により大腸腺腫やがんなどの診断が確定している。

#### 【調査方法】

(1) 肉類・脂肪酸の摂取量は、66食品から構成される食物摂取頻度調査票の回答結果を用いて算出した。この食物摂取頻度調査票から推定した摂取量は、疫学研究として疾患との関連を検討する上での妥当性が担保されている。

(2) 腸内細菌叢の解析は、先行する別研究において便検体が得られた全対象者について16S rRNA解析を実施した。また、大腸腫瘍症例125人(がん30例、高度異形腺腫26例、10mm以上の腺腫69例)とランダムサンプリングした対照群194人の計319人に対して、ショットガンシーケンスによるメタゲノム解析も行われている。

(3) 代謝物は、保存血漿検体を用いて液体クロマトグラフ質量分析計により、一次・二次胆汁酸・三次胆汁酸の濃度(抱合型および遊離型)を測定した。本研究においてはショットガンシーケンスによるメタゲノム解析の結果が利用可能な319人を分析対象とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 代謝物の測定

大腸腫瘍症例125人とランダムサンプリングした対照群194人の計319人のうち、血漿検体が利用可能な303人を対象に、胆汁酸を含む約500の代謝物を対象に液体クロマトグラフ質量分析計による測定を実施した。その結果、抱合型一次胆汁酸4種、遊離型一次胆汁酸2種、抱合型二次胆汁酸3種、遊離型二次胆汁酸1種、その他胆汁酸代謝物4種、合計14種の濃度を取得した。そのうち、5種(Chenodeoxycholic acid、Glycocholic acid、Glycochenodeoxycholic acid、Glycolithocholic acid sulfate、Glycoursodeoxycholic acid)の胆汁酸濃度は、すべての検体が検出下限値以上の値であった。その他、検出下限値以上の値の占める割合が、対象集団の90%以上であった胆汁酸は4種(Deoxycholic acid、Taurochenodeoxycholic acid、Glycodeoxycholic acid、Taurodeoxycholic acid)、70%以上が3種(Cholic acid、Taurocholic acid、Tauroolithocholic acid)のこりは64%(Glycolithocholic acid)と46%(Tauromurocholic acid)であった。

##### (2) 肉類・脂肪酸の摂取量と大腸腫瘍リスクとの関連

大島研究の参加者のうち、大腸内視鏡検査の結果、大腸腫瘍あり(がん・腺腫543人)を症例群、病変なし(425人)を対照群として、食物摂取頻度調査票の回答結果から算出した肉類・脂肪酸の摂取量を比較した。対照群の摂取量の分布に基づき、4分位点を用いてカテゴリを作成し、最小摂取群を基準としてロジスティック回帰分析によりオッズ比を算出した。その際、性別、年齢、喫煙、飲酒、身体活動量、肥満度(body mass index)、大腸がんの家族歴、非ステロイド性抗炎症薬の使用歴で調整した。その結果、肉類摂取、赤肉摂取、家禽肉摂取との間に有意な関連は観察されなかった。また、脂肪酸のうち、飽和脂肪酸・一価不飽和脂肪酸・n-3不飽和脂肪酸の摂取量との間にも有意な関連を認めなかったが、多価不飽和脂肪酸・n-6不飽和脂肪酸の摂取量との間には正の関連が見られ、いずれも傾向性の検定において統計学的に有意な結果を認めた。

### (3) 腸内細菌叢と大腸腫瘍リスクとの関連

大島研究の参加者のうち、大腸内視鏡検査の結果、大腸腫瘍あり(がん・腺腫 560 人)を症例群、病変なし(480 人)を対照群として、便検体由来 DNA を用いた 16S rRNA 解析による腸内細菌叢データを用いて、大腸腫瘍リスクとの関連を検討した。その結果、多様性解析において、多様性の違いは認めなかったが、多様性は有意に異なっていた。門レベル・属レベルの相対存在量の比較では、一般線形モデルを用いた多変量解析により交絡因子を調整した回帰係数を算出し、false discovery rate を調整した p 値が 0.1 未満の場合に統計学的に有意な結果と判断した。門レベルの解析では、性・年齢・肥満度・喫煙・身体活動・糖尿病既往・大腸がん家族歴で調整した際に症例群で *Fusobacteria* の存在量が有意に多いという結果であったが、さらに飲酒・総エネルギー・穀類・野菜類・果物類・赤肉・加工肉・魚類・乳製品類・コーヒーで調整したところ、統計学的に有意な差は認めなかった。また属レベルの解析では、性・年齢・肥満度・喫煙・身体活動・糖尿病既往・大腸がん家族歴で調整した結果において、症例群では *Romboutsia*、Christensenellaceae 科の *AY442821\_g*、*Tricibacter*、*Fusobacterium* の存在量が有意に多かった。しかし、前述の食事要因で調整すると *Romboutsia* 以外は統計学的に有意な差が消失した。また、今回の解析では、二次胆汁酸の代謝に関連すると言われている *Clostridium*をはじめ、先行研究において関連が示唆されている *Actinomyces* や *Streptococcus* については有意な差を認めなかった。

### (4) 胆汁酸代謝物濃度と大腸腫瘍リスクとの関連

代謝物の測定を実施した 303 人から、がん・大腸ポリープ・大腸の手術の既往がある人、食物摂取頻度調査票の回答結果から算出したエネルギー摂取量の上位または下位 2.5 パーセント以内該当する人、過形成ポリープなどの病変を保有する人を除外した 228 人を解析対象とした(症例群 158 人、対照群 70 人)。

測定値が得られた 14 種の代謝物の中央値と四分位範囲を表にまとめた。対照群の濃度分布に基づき、3 分位点を用いてカテゴリを作成し、最低濃度群を基準としてロジスティック回帰分析によりオッズ比を算出した。その際、性別、年齢、喫煙、飲酒、身体活動量、肥満度 (body mass index) で調整した。その結果、Glycocholic acid との間に正の関連(傾向性の検定:  $p = 0.08$ )、Glycolithocholic acid との間に負の関連(傾向性の検定:  $p = 0.06$ ) が示唆された。それ以外の代謝物については、統計学的に有意な関連を認めなかった。

Glycocholic acid を始めとする抱合型一次胆汁酸は、先行研究においても大腸がんリスクとの間に有意な正の関連が報告されており (J Natl Cancer Inst. 2020;112:516-524.)、本研究における結果もそれに一致するものであった。しかし、Glycochenodeoxycholic acid、Taurocholic acid、Taurochenodeoxycholic acid などの抱合型一次胆汁酸については、関連を認めず、先行研究とは異なっていた。今回は、予算の都合により大島研究の一部の参加者しか代謝物の測定を実施することができなかったが、今後は残りの対象者についても代謝物の測定を行い、サンプルサイズを増やす必要がある。その後、前述の(2)および(3)の成果を踏まえ、食事因子・腸内細菌・代謝物の組み合わせなどによる複合的な作用の解明を試みる。

表. 14 種の胆汁酸代謝物濃度の中央値と四分位範囲

	Case				Control			
	Number	Median	25th percentile	75th percentile	Number	Median	25th percentile	75th percentile
Cholic acid	123	0.400	0.200	1.020	45	0.289	0.142	0.497
Chenodeoxycholic acid	158	0.300	0.135	0.503	70	0.195	0.089	0.620
Deoxycholic acid	148	0.512	0.232	0.934	63	0.445	0.244	1.100
Glycocholic acid	158	0.117	0.060	0.246	70	0.084	0.050	0.237
Glycochenodeoxycholic acid	158	5.785	2.910	12.300	70	4.970	2.050	14.000
Taurocholic acid	124	0.079	0.044	0.186	53	0.080	0.045	0.172
Taurochenodeoxycholic acid	157	0.147	0.071	0.358	70	0.128	0.067	0.300
Glycodeoxycholic acid	152	1.125	0.322	2.875	66	1.220	0.309	2.840
Glycolithocholic acid	101	0.011	0.007	0.022	45	0.013	0.009	0.018
Taurodeoxycholic acid	146	0.049	0.015	0.144	67	0.047	0.018	0.090
Glycolithocholic acid sulfate	158	0.504	0.130	1.270	70	0.541	0.083	1.210
Glycoursodeoxycholic acid	158	0.127	0.051	0.289	70	0.116	0.057	0.307
Taurolithocholic acid	116	0.004	0.002	0.011	46	0.006	0.003	0.010
Tauromurocholic acid	75	0.021	0.009	0.044	29	0.010	0.005	0.026

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 1件）

1. 著者名 Taguri Masataka, Kuchiba Aya, Yamaji Taiki, Sawada Norie, Goto Atsushi, Iwasaki Motoki, Tsugane Shoichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Importance of circulating leptin and adiponectin in the causal pathways between obesity and the development of colorectal cancer in Japanese men.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Epidemiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2188/jea.JE20230148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Motoki Iwasaki
2. 発表標題 Plasma biomarker studies on cancer within the Japan Public Health Center-based prospective study.
3. 学会等名 International Symposium "Pan-cohort studies; The future of population health"（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rieko Kanehara, Taiki Yamaji, Keishi Kameyama, Nozomu Kobayashi, Takahisa Matsuda, Motoki Iwasaki
2. 発表標題 Association between the gut microbiota and colorectal neoplasms in the Oshima study.
3. 学会等名 第34回日本疫学会学術総会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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