

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460812

研究課題名(和文)メタゲノム解析による胆汁中微生物の検索及び検出微生物と胆嚢がん発症との関連

研究課題名(英文) METAGENOMICS OF MICROBIAL COMMUNITIES IN GALLBLADDER BILE FROM PATIENTS WITH GALLBLADDER CANCER OR CHOLELITHIASIS

研究代表者

土屋 康雄 (TSUCHIYA, Yasuo)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60334679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：感染症と胆嚢癌発症との関連が報告されているが、一致した結果は得られていない。本研究は、胆嚢癌患者7例と胆石症患者30例を対象とし、各々の胆嚢胆汁内細菌叢を比較し、胆嚢癌発症との関連が示唆される菌を検出することを目的とした。

胆嚢癌患者3例(42.9%)と胆石症患者4例(13.3%)の胆汁中から抽出したDNAをメタゲノム解析し、存在する細菌叢を明らかにした。胆嚢癌患者の優先菌種はフソバクテリウム属菌、大腸菌、エンテロバクター属菌、胆石症患者のそれは大腸菌、サルモネラ属菌、エンテロコッカス属菌であった。胆嚢癌患者の胆汁内優先菌種と胆嚢癌発症との関連についてはさらに例数を増やした研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：Salmonella typhi and Helicobacter infections have been shown to increase risk of gallbladder cancer (GBC), but findings have been inconsistent. Other bacterial infections may also be associated with GBC. We aimed to investigate the microbial communities in gallbladder bile of patients with GBC and cholelithiasis (CL). DNA was extracted from bile in seven GBC patients and 30 CL patients, and the V3-V4 region of 16S rRNA was amplified. The sequencing results were compared with the 16S database. DNA was detected in the bile of three GBC (42.9%) and four CL patients (13.3%). As the predominant species, Fusobacterium nucleatum, Escherichia coli, and Enterobacter sp. were detected in bile from GBC patients. Those in bile from CL patients were Escherichia coli, Salmonella sp., and Enterococcus gallinarum. Whether the three bacteria detected in bile from GBC patients would be associated with the development of GBC just like colorectal cancer remains unknown.

研究分野：医歯薬学

キーワード：胆嚢癌 胆石症 胆嚢胆汁 次世代シーケンサー メタゲノム解析 16S rRNA

1. 研究開始当初の背景

胆嚢がんは世界的には稀な腫瘍であるが、地理的、民族的集積性を示すことが特徴である。多くの腫瘍は、遺伝-環境交互作用によって発症することが知られており、チリ、ボリビア、ペルー、インドなどの胆嚢がん多発国では特有の環境、遺伝要因が存在することが示唆される。しかし、その要因については明確な結論は得られていない。

胆嚢がん発症に胆石の存在が関与していることは多くの研究で明らかにされている。しかし、胆石のみならず他の要因も関与していることが示されている。腸チフス菌やヘリコバクターピロリ菌感染が胆嚢がん発症と関係しているとの報告があるが、結果は一致したものではない。感染症と胆嚢がん発症との関連が指摘されていることから、これらの菌以外の感染との関連も考えられる。しかし、胆嚢がん患者の胆汁中微生物に関する研究は少ない。

我々は、「胃がんとヘリコバクターピロリ菌感染の関係のように、体液を含む臓器の腫瘍は体液中に存在する菌によって発症する」という仮説をたてた。より具体的には、「胆嚢がんは胆汁中に存在する腸チフス菌やヘリコバクターピロリ菌、あるいは他の未知の菌によって発症する」という仮説をたて、本研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、感染症と胆嚢がん発症との関係を明らかにするため、胆嚢がん患者と胆石症患者の胆嚢胆汁中に存在する菌叢を比較し、胆嚢がん発症と関連があると考えられる菌種を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 対象者

胆嚢がん患者 7 例 (ボリビア 2 例、チリ 5 例) と胆石症患者 30 例 (ボリビア 22 例、チリ 8 例) を対象とした。対象とした胆嚢がん患者と胆石症患者は、ボリビア患者は、2014 年 8 月から 2015 年 8 月までラパスのボリビア・日本消化器センターで診断された。チリ患者は、2014 年 12 月から 2016 年 5 月までにサンティアゴのソテロ デル リオ病院で診断された。

(2) 胆汁採取

胆嚢胆汁は、各々の病院で胆摘後の胆嚢から吸引穿刺法によって少なくとも 1 mL 採取し、採取後の試料は直ちにフリーザー中に保存した。保存胆汁試料は冷凍状態で日本に運ばれ、測定に供した。

(3) 胆汁からの DNA 抽出

市販の DNA 抽出キット (NucleoSpin Soil、MACHERY-NAGEL 社) を用いて胆汁中から DNA

を抽出した。抽出後の DNA は AMPureXP (ベックマン・コールター社) を用いて精製処理を行った。

(4) ライブラリーの調整

アンプリコン PCR

16S rRNA の V3-V4 領域の増幅を、Tks Gflex DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ社)、Nextera XT Index Kit (イルミナ社) の試薬を用いて行った。使用した 2 種類のライマー配列は、341F : 5' -TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'、806R : 5' -GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGACACAGGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' であり、PCR 増幅条件は、94 60 秒 (1 サイクル)、98 10 秒、50 15 秒、68 15 秒 (28 サイクル)、4 (Hold) とした。

PCR クリーンアップ

AMPureXP (ベックマン・コールター社) を用いて PCR 産物の精製を行った。

インデックス PCR

PCR 増幅が確認された試料は、16S rRNA 増幅産物を鋳型とし、各試料に固有のインデックス配列付きのプライマーを使用して PCR を行った。PCR 増幅条件は、94 60 秒 (1 サイクル)、98 10 秒、60 15 秒、68 15 秒 (8 サイクル)、4 (Hold) とした。

PCR クリーンアップ - 2

AMPureXP (ベックマン・コールター社) を用いて精製を行い、その PCR 産物をシーケンスライブラリーとした。

シーケンスライブラリーの品質検定、混合作成されたシーケンスライブラリーの品質を、Agilent 2200 TapeStation (アジレントテクノロジー社) を用いて測定し、品質基準を満たしているライブラリーを混合した。

シーケンス解析

シーケンサー MiSeq 装置 (イルミナ社) 及び MiSeq Reagent Kit v3 試薬 (イルミナ社) と Phix Control Kit v3 試薬 (イルミナ社) を用いてクラスターを形成した。その後、MiSeq 装置を用いてシーケンス解析を行った。

16S rRNA 菌叢比較

シーケンス解析で得られた全試料分のリード (リード 1、リード 2 ごと) を統合して、リード 1 とリード 2 のアセンブル、クラスタリングおよび代表配列の抽出を行った。アライメントおよび代表配列の抽出にはプログラム CD-HIT-OUT (0.0.1 版) を用いた。代表配列をクエリとして、プログラム BLAST (2.2.20 版) と DDBJ 16S rRNA データベース (2016_08_17 版) を用いて相同性検索を行った。統計分類は、解析ツール QIIME パイプライン

(1.8版) プログラム RDP classifier (2.2版) データベース GreenGenes (最新版) を用いて行った。

系統樹データの作成は、装置 QIIME パイプライン (1.8版) プログラム PyNAST (1.2版) と FastTree (2.1.3版) テンプレートアライメント GreenGenes (最新版) を用いて行い、解析結果を得た。

菌叢比較解析は、QIIME 16S rRNA 解析用パイプライン (1.8版) を用いて行った。

(5) 倫理的声明

本研究は、新潟医療福祉大学の倫理委員会によって承認された (No. 17540-141030)。研究は 1964 年のヘルシンキ宣言の倫理基準を遵守して実施した。研究を開始するにあたり、ポリビアとチリの研究者が、本研究の目的、方法、期待される結果、研究に参加することによるリスクと利益などを患者に説明し、全参加者からインフォームドコンセントを得た。

(6) 統計解析

統計解析は、Stata Data Analysis and Statistical Software (STATA14) を用いて行った。二群間の有意差はカイ二乗検定、もしくはフィッシャーの正確確率検定で行い、 $P < 0.05$ を有意差有りとした。

4. 研究成果

(1) ポリビアとチリの胆嚢がん患者の胆汁中からの菌検出率

表 1 に胆汁中からの菌検出率を示す。ポリビア胆嚢がん患者と胆石症患者の胆汁中からの菌検出率はそれぞれ 50.0% (1/2) と 13.6% (3/22) であり、両群間の検出率には有意差は認められなかった。一方、チリ胆嚢がん患者と胆石症患者の胆汁中からの菌検出率はそれぞれ 40.0% (2/5) と 12.5% (1/8) であり、両群間には有意差は認められなかった。胆嚢がん患者及び胆石症患者の胆汁中からの菌検出率はポリビアとチリで各々ほぼ近似した値を示した。

表 1 胆嚢胆汁からの菌検出率

	胆嚢癌患者 n (%)	胆石症患者 n (%)	OR	95% CI	P値
ポリビア					
陰性	1 (50.0)	19 (86.4)	1.0		
陽性	1 (50.0)	3 (13.6)	6.33	0.52-80.3	0.312
計	2	22			
チリ					
陰性	3 (60.0)	7 (87.5)	1.0		
陽性	2 (40.0)	1 (12.5)	4.67	0.40-50.1	0.510
計	5	8			
合計					
陰性	4 (57.1)	26 (86.7)	1.0		
陽性	3 (42.9)	4 (13.3)	4.88	0.88-28.2	0.108
計	7	30			

OR: オッズ比, 95%CI: 95%信頼区間

これまで、ポリビア胆嚢がん患者と胆石症患者の胆汁中に存在する菌を検出したという報告は認められていない。しかし、チリ胆嚢がん患者の胆汁中からの菌検出率は 44.8%

(Roa ら、1999) 81.0% (Csendes ら、1994) であることが報告されている。次世代シーケンサーを用いた本研究ではチリ胆嚢がん患者の胆汁中からの菌検出率は 40.0%であった。本研究では、これまでの報告に比べより低い菌検出率を示した。が、その理由を明らかにすることはできなかった。その一因として、近年、頻繁な患者への抗生物質投与によって感染率が低下している可能性が示唆された。

(2) ポリビアの胆嚢がん患者と胆石症患者の胆汁中から検出された菌種

表 2 にポリビア患者の胆汁中から検出された菌名を示す。胆嚢がん患者 1 例の胆汁中からは 24 種類、胆石症患者 3 例の胆汁中からは計 12 種類の菌が検出された。

表 2 ポリビア患者の胆汁中から検出された菌

菌種	GBC	CL-1	CL-2	CL-3
<i>Escherichia coli</i>	+	++		+
<i>Enterococcus gallinarum</i>				++
<i>Salmonella</i> sp. ATK1		+	++	
<i>Bacteroides fragilis</i>	+			
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp.	++			
<i>Pyramidobacter piscotens</i>	+			
<i>bacterium</i> NLAE-zl-H528	+			
<i>Odoribacter splanchnicus</i> DSM 2071	+			
<i>Anaeroglobus</i> sp. S4-A15	+			
<i>bacterium</i> IARFR1475	+			
<i>Sireptococcus</i> sp. ChDC B623	+			
<i>Veillonellaceae bacterium oral taxon</i>	+			
<i>Methylobacterium zatmanii</i>		+	+	
<i>Clostridium</i> sp.	+			
<i>Selenomonas sputigena</i>	+			
<i>Enterococcus faecalis</i>				+
<i>Bacteroides uniformis</i>	+			
<i>bacterium</i> NLAE-zl-H504	+			
<i>bacterium</i> 28W412	+	+	+	
<i>Clostridium perfringens</i>				+
*** no hit ***	+	+	+	
<i>Dialister pneumosintes</i>	+			
<i>Selenomonas artemidis</i>	+			
<i>Klebsiella</i> sp.		+	+	
<i>Agrobacterium larrymoorei</i>		+		
<i>Prevotella denticola</i>	+			
<i>bacterium</i> P1C8	+			
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	+	+	+	
<i>Pseudomonas koreensis</i>	+	+		
<i>Slackia</i> sp. CM382	+			
<i>Bacteroides salyersiae</i>	+			

GBC: 胆嚢がん患者, CL: 胆石症患者

++: 優先菌種, +: 検出された菌

胆嚢がん患者の胆汁中の優先菌種は、フソバクテリウム ヌクレアタムであった。この菌は口腔から分離されることが知られており (Gharbia ら、1990) 日和見感染症の原因となる細菌のひとつである。しかし、2011 年以降、多くの研究は、フソバクテリウム ヌクレアタム感染が結腸直腸がんリスクの上昇と関係していることを報告している (Ray、2011; Miwa ら、2015; Noshō ら、2016)。原発性硬化性胆管炎や潰瘍性大腸炎患者は胆管細胞がんや胆嚢がんの高リスク群であることが報告されている (Yamamoto ら、2003; Pastogi ら、2012)。フソバクテリウム ヌクレアタムやその他の細菌は、潰瘍性大腸炎患者から検出されている (Andoh ら 2007)。このことから、フソバクテリウム ヌクレアタムが胆嚢がん患者の胆汁中から検出された

という我々の知見は、胆嚢がんリスク、潰瘍性大腸炎、フソバクテリウムヌクレアタム感染との関係のなかで説明できるかもしれない。

(3) チリ胆嚢がん患者と胆石症患者の胆汁中から検出された菌種

表3にチリ患者の胆汁中から検出された菌名を示す。胆嚢がん患者2例の胆汁中からは計8種類、胆石症患者1例の胆汁中からは2種類の菌が検出された。

表3 チリ患者の胆汁中から検出された菌

菌種	GBC-1	GBC-2	CL
<i>Escherichia coli</i>		++	++
<i>Enterobacter</i> sp. B10 (2014)	++	+	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	
<i>bacterium</i> NLAE-zl-P344		+	
<i>Streptococcus sanguinis</i>			+
<i>Enterococcus durans</i>		+	
<i>Propionibacterium acidifaciens</i>		+	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		+	
<i>Citrobacter</i> sp. AL7	+		

GBC: 胆嚢がん患者, CL: 胆石症患者

++: 優先菌種, +: 検出された菌

チリ胆嚢がん患者の胆汁中優先菌種は大腸菌とエンテロバクター属菌であった。これらの菌はこれまでのチリの胆嚢がん患者を対象とした研究で胆汁中から検出されている (Csendes ら、1994 ; (Roa ら、1999)) ので、チリ胆嚢がん患者の胆汁中にはこれらの菌が常在している可能性が示唆された。これに対して、胆石症患者の胆汁中優先菌種は大腸菌であった。

本研究で胆嚢がん患者の胆汁中の優先菌種であったフソバクテリウムヌクレアタム、大腸菌、エンテロバクター属菌感染は結腸がんの発症と関連していることが報告されている (Gagnaire ら、2017) 。従って、胆汁中のこれらの菌の存在は結腸がんと同様のメカニズムによって胆嚢がんリスクを上昇させている可能性がある。しかし、これらの菌感染と胆嚢がん発症との関連についてはさらに検討が必要である。

我々の当初の予想に反して、腸チフス菌は胆嚢がん患者の胆汁中からは検出されなかった。これは、検討した試料数が少なかったことがその一因と考えられたが、チリにおける腸チフス感染が減少していることと関係があるかもしれない。腸チフスは腸チフス菌の感染によって発症する疾患である。腸チフスは、1976年から1985年までの間、チリにおける一般的な疾患であり、その率は10万人当たり100-121であった。しかし、その後漸減し、現在は10万人当たり3.3程度となっている (Andia ら、2008) 。胆嚢がん患者の胆汁中から腸チフス菌が検出されなかった一因として、腸チフス感染率の低下を反映していることが考えられた。

胆嚢がん患者の胆汁中からはヘリコバクター属菌も検出されなかった。これまでにポリビアとチリの胆嚢がん患者を対象としてヘリコバクター属菌を検出した報告は認められていない。しかし、PCRを使ってチリ胆嚢炎患者の胆汁と胆嚢組織中からヘリコバクター属菌が検出されたとの報告がある (Fox ら、1998) 。検出された菌は、ヘリコバクターピリスら3種類であったが、著者らは、胆汁抵抗性のヘリコバクター菌感染と胆嚢疾患との関係を示唆し、胆嚢がん発症におけるこれらの菌の役割を明らかにする必要があると述べている。今後、例数を増やした検討によりヘリコバクター属菌感染と胆嚢がん発症との関係を明らかにする必要がある。

本研究には、いくつかの限界がある。まず、検討に用いた試料数が少なかったため、胆汁中からの正確な菌検出率を表していないかもしれない。また、胆嚢がん患者と胆石症患者間に菌検出率に有意差が認められなかったのは例数が少なかったことに起因している可能性がある。このことは、幅広い95%信頼区間を示したことから明らかであった。次に、ポリビア胆嚢がん患者はチリ患者より多くの菌が胆汁中から検出された。しかし本研究ではその原因を明らかにすることができなかった。その要因として、民族や生活環境の差が示唆されたが、胆嚢がん患者や胆石症患者の胆汁中から検出される菌には地域差が認められるのかどうか、今後の課題として残された。このように本研究にはいくつかの限界があるが、次世代シーケンサーを用いて、胆嚢がん患者と胆石症患者の胆汁中の細菌叢を比較した最初の研究である。

本研究では、16S rRNAメタゲノム解析を用いてポリビアとチリの胆嚢がん患者と胆石症患者の胆嚢胆汁中に存在する細菌叢の実態を明らかにした。胆嚢がん患者の胆嚢胆汁中からは、フソバクテリウムヌクレアタム、大腸菌、エンテロバクター属菌が検出されたが、これまで胆嚢がん発症との関連が指摘されている腸チフス菌やヘリコバクター属菌は検出されなかった。胆嚢がん患者の胆嚢胆汁中からは、フソバクテリウムヌクレアタム、大腸菌、エンテロバクター属菌が検出されたという我々の知見は、ポリビアとチリにおける胆嚢がんの成因解明に関する基礎的データを提供するものである。しかし、本研究で胆嚢がん患者の胆汁中から検出された菌が胆嚢がん発症にどのような役割を果たしているかはさらに例数を増やした検討で明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 康雄 (TSUCHIYA, Yasuo)
新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員
研究者番号：60334679

(2) 研究分担者

山本 正治 (YAMAMOTO, Masaharu)
新潟医療福祉大学・健康科学部・教授
研究者番号：40018693

浅井 孝夫 (ASAI, Takao)
新潟医療福祉大学・医療技術学部・助教
研究者番号：60612736

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

エルネスト ロサ (Ernest LOZA)
ポリビア・日本消化器センター

ガイド ヴィラ-ゴメス (Guido
VILLA-GOMEZ)
ポリビア・日本消化器センター

カルロス トルヒーヨ (Carlos TRUJILLO)
ポリビア・日本消化器センター

セルジオ バエス (Sergio BAEZ)
ソテロ デル リオ病院

奥田 華代 (OKUDA, Kayo)
タカラバイオ株式会社

野崎 涼子 (NOZAKI, Ryoko)
臨床検査技師