

令和 2 年 7 月 12 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10627

研究課題名（和文）炎症性腸疾患におけるDysbiosisと腸内細菌代謝産物が発癌に与える影響の解析

研究課題名（英文）Effects of Dysbiosis and intestinal bacterial metabolites on carcinogenesis of CAC

研究代表者

倉地 清隆（Kurachi, Kiyotaka）

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：20397384

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：過去の手術症例において、当時の切除検体保存状態が想定以上に悪く、DNAのクオリティが悪い症例は除外する必要があった。そのため、目標症例数に到達することができなかった。また次世代シーケンサーのデータからは、癌を伴わないIBD症例とCAC症例の腸内細菌叢の構成成分の相違が明らかとならず、CAC症例に特異的にみられる細菌種は同定されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CAC症例は増加傾向にあり、その発癌メカニズム解明と予防法の確立はIBD患者の予後向上のための喫緊の課題である。現在のところCAC特異的な腸内細菌叢の変化、およびMetaboliteの変化は同定することができていないが、脂質代謝変化などの興味深い知見は得られているため、今後もさらに解析を続けていく予定である。

研究成果の概要（英文）：In the past surgical cases, the condition of FFPE specimens was worse than expected and the DNA quality was poor. Therefore, it was necessary to exclude such cases and we could not reach the target number of cases. In addition, the data of the next-generation sequencer did not reveal any difference in the components of the intestinal flora between IBD cases without cancer and CAC cases, and no bacterial species specific to CAC cases were identified.

研究分野：下部消化管悪性腫瘍

キーワード：炎症性腸疾患 発癌 腸内細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Colitis-Associated Cancer(CAC)は、IBD 患者の死因の約 15%を占める最も重要な予後規定因子であり、CAC の発癌予防が IBD 患者の予後改善のための喫緊の課題である。CAC 発癌は強い炎症を背景とするため様々なメカニズムが提唱されているものの、その詳細は未だ十分に解明されておらず、予防戦略も確立されていない。

腸内細菌やその代謝産物と IBD の病態形成に関しては、これまで数多くの報告がある。腸内細菌を構成する *Clostridium butyricum* の代謝産物である酪酸が Foxp3 陽性の制御性 T 細胞 (Treg) の分化誘導を促進させ、炎症を抑制することが明らかとなっている。IBD においては Dysbiosis の結果、*Clostridium butyricum* の量が減少、酪酸産生の低下により Treg への分化誘導が阻害されることが、発症の一因であることが実験的に示されている。(Furusawa et al. Nature 2013)。また最近の研究では、腸内細菌によってトリプトファンが indole-3-acetic acid (IAA) に代謝され、IAA が T 細胞上の aryl hydrocarbon receptor (AHR) のリガンドとして働き IL-22 の産生を促進することで腸内細菌叢の恒常性維持に働くことが示された (Lamas et al. Nat Med 2016)。これらの報告から、IBD の病態形成には Dysbiosis から起因する特異的な腸内細菌とその代謝産物が強く関与することが示唆されている。

発癌と Dysbiosis に関しても、近年興味深い結果が報告されている。腸管と口腔内の常在菌である *Fusobacterium* 属通常型の大腸癌組織内に高頻度に検出され、さらに興味深いことにマイクロサテライト不安定性を示す MSI-H の癌に高頻度に検出されることが示された (Nosho et al. World J Gastroenterol. 2016)。以上の観点から、Dysbiosis が CAC 発癌に重要な役割を果たしていることは強く示唆されるが、CAC の発癌との関連についてはこれまでほとんど報告はなく、詳細は分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、IBD 切除症例の FFPE サンプルを用いて、NGS による 16S rRNA のメタゲノム解析を行い、腸内細菌叢を構成する細菌種の同定、構成比率の違いを明らかにする。癌を伴わない IBD 症例と CAC 症例の腸内細菌叢の構成成分の違いを潰瘍性大腸炎症例とクローン病それぞれで解析することにより、CAC 症例にみられる特異的な細菌種の同定、および構成比率の変化を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 1990 年以降の IBD 切除症例の FFPE サンプルを用いた、NGS による 16S rRNA の解析

浜松医科大学第二外科において 1990 年以降に切除された潰瘍性大腸炎症例 (約 120 例)、クローン病症例 (約 200 例)、および CAC 症例 (約 20 例) の FFPE 標本から DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた菌叢比較解析を行うことにより、検体間の菌叢の違いを明らかにする。

2) マススペクトロメトリー法を用いた各細菌種における特異的代謝産物の同定。

上記 1) にて得られた解析結果から、CAC 症例に特異的にみられる細菌種の同定、および菌種組成の違いを明らかにする。CAC 発癌に関与していると考えられる菌種の候補を抽出し、細菌培養を行う。候補に挙げた細菌についてこれまでの報告を参照し、必要に応じてトリプトファンなどの基質を添加した上で培養を行う。その培養上清を採取し、液体クロマトグラフィー (LC/MS) を用いて Metabolome 解析を行う。得られたデータをもとに原因となる Metabolite を抽出する。

3) 抽出された代謝産物阻害剤による CAC モデルマウスを用いた CAC 発癌予防実験

上記 2) によって抽出された、CAC 発癌に関与している可能性のある Metabolite の代謝経路を文献的に検索し、その経路の阻害剤を入手する。AOM/DSS マウスを用いた CAC モデルマウスに阻害剤を投与し、発癌までの期間、腫瘍重量、生存期間、組織学的変化を解析し、CAC 発癌に対する予防戦略の構築を行う。

4. 研究成果

1) 1990 年以降の IBD 切除症例の FFPE サンプルを用いた、NGS による 16S rRNA の解析
潰瘍性大腸炎症例 115 例、クローン病症例 215 例、および CAC 症例 20 例の FFPE 標本から DNA を抽出した。次世代シーケンサー解析が可能なくオリティーが得られた標本は 155 例 (47%) であり、研究開始時の想定より低い結果であった。

原因としては 2000 年以前の古い標本の保存状態が悪かったためと考えられた。DNA 抽出方法を変更して再度評価したが、信頼性のあるデータを得るには不十分であると判断した。

を用いた菌叢比較解析を行うことにより、検体間の菌叢の違いを明らかにする。

2) マススペクトロメトリー法を用いた各細菌種における特異的代謝産物の同定。

上記 1)にて得られた 155 例の DNA から、CAC 症例に特異的にみられる細菌種の同定、および菌種組成の違いの解明を試みたが、統計学的に有意な差を検出することが出来なかった。

CAC 症例に増加している傾向のあった細菌種に関して、さらに Metabolome 解析を試みたが、有意な相違を検出することが出来なかった。

3) 抽出された代謝産物阻害剤による CAC モデルマウスを用いた CAC 発癌予防実験

上記 2)で傾向が見られた脂質代謝に着目し、阻害剤による発癌抑制実験を試みたが、仮説を立証する結果は得られなかった。

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	今野 弘之 (Konno Hiroyuki) (00138033)	浜松医科大学・医学部・学長 (13802)	
研究分担者	山本 真義 (Yamamoto Masayoshi) (70397420)	浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教 (13802)	
研究分担者	原田 岳 (Harada Takashi) (00537251)	浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教 (13802)	