

令和 3 年 6 月 30 日現在

機関番号：92648
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2020
課題番号：19K18981
研究課題名（和文）大腸癌由来Fusobacterium nucleatumの病原性に関する研究

研究課題名（英文）Studies on the pathogenicity of Fusobacterium nucleatum isolated from colorectal cancer

研究代表者
杉 由高（Sugi, Yutaka）

協同乳業株式会社研究所・研究所・研究員

研究者番号：30646013

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では大腸癌分離株と口腔常在菌株との違いを明らかにすることを目的としてF. nucleatumのゲノム解析を行った。全ての大腸癌分離株が保有する一方で、唾液分離株からは全く検出されない遺伝子が複数特定できた。また、大腸癌由来のF. nucleatum分離株数を増やすことを目的に新規に臨床検体からの分離培養を行い、大腸癌由来分離株として5株、唾液由来分離株として14株のF. nucleatum分離株が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌のF. nucleatumが口腔に由来することから、口腔内のF. nucleatumを調べることは大腸癌の増悪化や再発防止に有用と考えられるが、中には単なる口腔常在菌として大腸癌とは関係のないF. nucleatumもいるようである。従って“大腸癌のF. nucleatum”とそうでないF. nucleatumの違いが明らかにできれば、口腔汚染指標に用いるなどして大腸癌リスク軽減のための検査方法の確立に役立てられると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the genome of F. nucleatum to clarify the differences between colon cancer isolates and oral indigenous strains. We detected several genes that all colorectal cancer isolates possessed, but salivary isolates did not possess at all. To increase the number of F. nucleatum isolates from colorectal cancer, we newly cultured F. nucleatum isolates from clinical specimens and obtained 5 isolates from colorectal cancer and 14 isolates from saliva.

研究分野：分子生物学

キーワード：大腸癌 Fusobacterium nucleatum

1. 研究開始当初の背景

Fusobacterium nucleatum は近年大腸癌の増悪化に強く関わることで注目されているグラム陰性細菌である。本菌は古くから歯周病の原因菌として知られる口腔細菌の一種であったため、大腸癌で検出される本菌も口腔に由来する可能性が考えられてはいたが、実際にそれを確かめた報告は存在していなかった。申請者らは以前、実際の大腸癌患者より得られた大腸癌の内視鏡切除検体と同一患者から採取した唾液を培養して、そこから同一菌株の ***F. nucleatum*** が分離できること、すなわち大腸癌で検出される ***F. nucleatum*** が口腔由来であることを実験的に示した。

分離培養の結果から「たくさんいる口腔の ***F. nucleatum*** の中から特定の菌株のみが大腸癌に移行するのではないかと考えられるデータが得られている。具体的には、唾液から圧倒的高頻度に分離された菌株であっても大腸癌から分離されなかったり、反対に唾液ではごく低頻度だったにも関わらず大腸癌からは高頻度に分離される菌株が存在していた。つまり、プロバイオティクス乳酸菌のように ***F. nucleatum*** においても菌株ごとに胃酸や消化酵素、宿主の免疫への耐性が異なり、最終的に大腸癌に定着・増殖できる菌株とそうでない菌株が存在する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本申請課題では、ヒト大腸癌患者より得られた大腸癌組織と唾液に由来する ***F. nucleatum*** のゲノムシーケンスを行い、大腸癌から分離された菌株と唾液から分離された菌株との間にもどのような違いがあるのか調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ゲノムシーケンスと情報解析：ゲノムシーケンスは PacBio 社の Sequel II を用いて行った。分解の少ない可能な限りインタクトなゲノム DNA の回収のため、DNA 抽出には酵素法を用いた。得られた塩基配列は Canu および Flye を用いてアセンブリした。遺伝子のアノテーションには Prokka を使用した。NCBI に登録がある ***F. nucleatum*** のゲノムサイズが概ね 2.0~2.5Mbp であることから、十分なカバレッジが確保できて、かつ 2.0Mbp 以上にアセンブリされたコンティグを情報解析に供した。

(2) ***F. nucleatum*** の分離培養：大腸癌の内視鏡切除検体のホモジネートおよび同じ患者から採取した唾液をナリジクス酸、バンコマイシン、ネオマイシン、クリスタルバイオレットを含む選択培地に塗抹して嫌気培養を行った。***Fusobacterium*** 属および ***F. nucleatum*** の種特異的プライマーを用いた PCR によって得られたコロニーが ***F. nucleatum*** であることを判定したのち、ゲノム DNA を抽出して 16S rRNA 遺伝子の全長配列をサンガーシーケンスによって確認した。

4. 研究成果

(1) リピートやコンタミネーションがなく、2.0Mbp 以上のサイズにアセンブリされたコンティグを大腸癌分離株として 18 株、唾液分離株として 30 株分得ることができた。

以前の論文では菌株の相同性を AP-PCR という古典的なフィンガープリンティング様の方法を用いて判定したが、全ゲノムシーケンスを行ったことで配列ベースの相同性が示せるようになった。大腸癌と唾液から分離した菌株のうち、同一の AP-PCR パターンを示す菌株ペア間のゲノムの相同性を ANI (Average Nucleotide Identity) によって評価したところ 99.99% 以上の値が得られたことから、これまでの仮説の通り大腸癌の ***F. nucleatum*** が口腔に由来することを示唆する結果を配列レベルで確認することができた。

全ゲノム配列の情報を用いて Mash 距離に基づいた系統樹を作成した。***F. nucleatum*** は ***F. nucleatum*** subsp. ***animalis***、***polymorphum***、***nucleatum***、***vincentii*** の 4 亜種に分類されており、各系統には同じ亜種が配置されることが分かったが、患者および分離した部位（大腸癌なのか唾液なのか）については系統に合致しなかった。従って、どの亜種だから大腸癌あるいは唾液に多いといった傾向は認められなかった。また、患者ごとに検出される亜種の偏りも認められなかった。

詳細な threshold の検討は今後さらに行う予定であるが、全ての大腸癌分離株が保有する一方で、唾液分離株からは全く検出されない遺伝子が複数検出できた。それらの遺伝子リストに

加えて分離培養による取りこぼしを加味して、唾液分離株でもある程度の保有をみとめながら、“大腸癌の *F. nucleatum*” に特徴的な遺伝子を絞り込んでいく作業を今後も継続していく。

(2) 7名分の唾液と大腸癌検体から 19 株の *F. nucleatum* が得られた。7名のうち大腸癌から *F. nucleatum* が分離できたのは 3名のみであったが、その 3名分の検体から大腸癌分離株として 5 株、唾液分離株として 14 株得ることができた。それら菌株の中には、大腸癌分離株と唾液分離株との間で同一の AP-PCR パターンを有する菌株が 3 ペア含まれていた。

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 1件）

1. 著者名 Takahashi Kyoko, Sugi Yutaka, Nakano Kou, Kobayakawa Tetsuro, Nakanishi Yusuke, Tsuda Masato, Hosono Akira, Kaminogawa Shuichi	4. 巻 4
2. 論文標題 Regulation of Gene Expression through Gut Microbiota-Dependent DNA Methylation in Colonic Epithelial Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 178 ~ 190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/immunohorizons.1900086	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
---------	---------