

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20955

研究課題名（和文）Microbiomeに着目した大腸de novo発癌様式の解明と治療法への応用

研究課題名（英文）Elucidation of de novo colon cancer carcinogenesis focusing on microbiome and application to therapeutics

研究代表者

田村 公二（TAMURA, Koji）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90909582

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）：本研究の主題であるde novo発癌例数が少なく、少し方向性を変更しFAP患者やIBD患者由来を含めた大腸癌組織での解析を行った。FAP由来大腸癌検体から複数部位の組織を採取し、scRNA-seqを施行した。クラスタリングにより細胞集団が同定され、既知のマーカー遺伝子を用いてcell typeを同定した。また、腫瘍微小環境のfibroblastのみを再クラスタリングしたところ、4つのクラスターが同定され、癌部と正常部での特異的な傾向を同定した。さらに免疫関連細胞群と各々の集団の遺伝子発現解析も進めている。便サンプルのmicrobiomeは解析に提出中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

de novo癌、FAP、colitic cancerを含む大腸癌の発癌メカニズムを腸内細菌叢及び腫瘍微小環境の不均一性という側面から検討することは、大腸癌治療開発において刷新的であり社会的な要請の強い大腸癌の治療開発に飛躍的な進歩をもたらすと期待される。また、本成果は、scRNAseq解析やmicrobiome解析などマスマデータを含むもので、そのインパクトは大きく、癌研究だけでなく、生物学や細菌学など学術的にも広範な波及効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：The number of de novo colon cancer cases was actually small, so we slightly changed the direction, and analyzed colorectal cancer (CRC) tissues including those from patients with FAP and IBD. The scRNA-seq was performed on CRC samples from multiple sites in the same patient. Cell populations were identified by clustering, and cell types were identified using known marker genes. In the tumor microenvironment, only fibroblast cells were re-clustered, and 4 clusters were identified, indicating some specific trends between cancerous and normal areas. Gene expression analysis of immune-related cell groups and their respective populations is also undergoing. Microbiomes of fecal samples are being submitted for analysis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大腸癌 de novo癌 腸内細菌叢 家族性大腸線種症

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌スクリーニング検査の推進や各種画像検査によって早期診断が可能となり、大腸癌の罹患数は年々増え続けるのと同時に、手術手技や手術成績は向上し有効な薬物療法の開発も進んでいる。それでもなお死亡者数は肺癌に次いで第2位で、高い致死率を示している。いわゆる adenoma-carcinoma sequence (ACS) における腺腫が大腸癌早期発見・治療の標的病変となり、大腸癌患者数の減少が期待されたが、正常大腸から直接発生する陥凹型の *de novo* 癌の存在が明らかとなり、早期発見が困難で悪性度も高いことが分かってきた。これら *de novo* 癌については様々な研究がなされ、若年発症で組織学的悪性度が高く右側結腸に多く KRAS 野生型が多い、などの特徴を持つが、その発癌・進展様式は未だ解明されていない。最近の癌研究では、大腸癌をはじめとする消化器癌において腸内細菌叢の組成が発癌に関与するという報告が散見される。しかしながら、現在まで *de novo* 大腸癌患者に着目して microbiome を解析・検討した報告はない。腸内細菌叢は癌細胞同様に、それ自体の不均一性が高い集団であることもよく知られている。癌微小環境である線維芽細胞や免疫、炎症細胞においても不均一性を認めており、当研究室では癌微小環境に着目してこれまで様々な研究・報告をしてきた。腸内細菌叢のみならず癌とその微小環境における microbiome が ACS 経路の大腸癌とどのように異なり、さらにはその発癌や進展にどのように関与しているかを明らかにすることで、特定の microbiome を標的とした治療法の開発や発癌自体の予防につながると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、腸内細菌叢だけでなく *de novo* 大腸癌の発癌や進展様式、さらには浸潤・転移に関わる腫瘍内や微小環境の microbiome を網羅的に解析し、新たな治療法の開発や発癌予防法の解明につなげることである。*de novo* 発癌メカニズム解明にあたり、腸内環境のみならず、癌腫自体と癌微小環境における microbiome、さらにはその不均一性に着目する。*de novo* 大腸癌発癌経路の解明によって、新規治療薬の開発さらには発癌の予防を最終的な目標とする。

### 3. 研究の方法

患者由来癌組織および背景正常組織中の細菌叢の microbiome 解析  
ヒトの切除大腸癌組織や転移巣(リンパ節・肝・肺・播種巣など)切除組織を用いて、細菌叢解析を行う。抽出した gDNA を 16s rRNA 領域プライマーを用いて PCR 増幅後、次世代シーケンサー(NGS)および解析ソフトを用いて塩基配列を決定する。ゲノムアセンブリ、遺伝子予測を行い、細菌系統組成を明らかにして公開されている細菌遺伝子データベースを用いて検索することで、微生物リストの作成を試みる。その結果、発癌や進展、転移や播種に関わる microbiome の候補を同定する。また、発癌の過程や背景となる正常大腸組織における ACS 経路大腸癌と *de novo* 大腸癌での microbiome の違いを解析する。同時性・異時性多発大腸癌患者においては、同一患者における各々の癌組織での microbiome 解析は非常に有用な結果を期待できる。同患者における術前の糞便中 microbiome 解析も同時に行う。

#### 大腸癌組織の分子異常解析

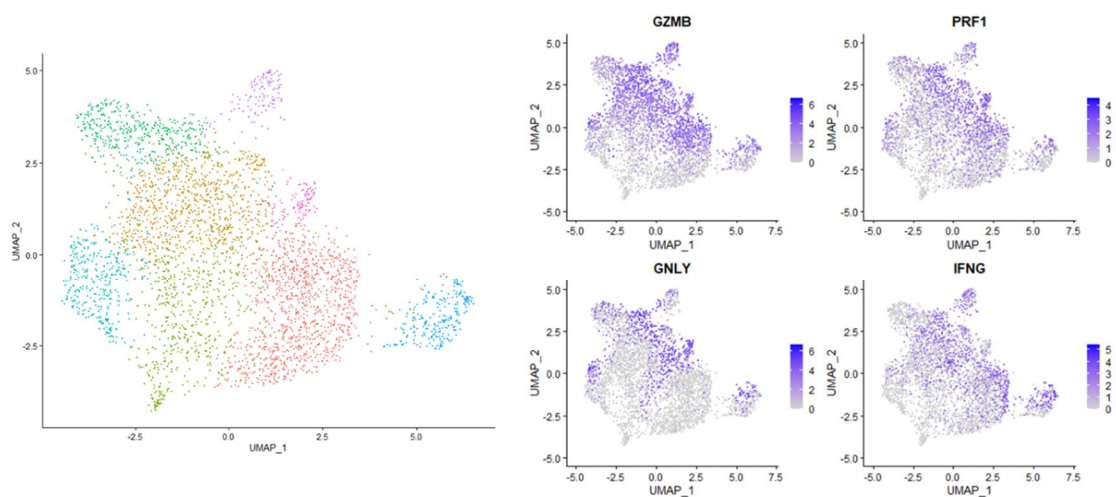
上述の microbiome 解析で用いた患者由来癌組織を用いて、タンパク発現、遺伝子変異、DNA メチル化異常などについても解析・検討する。HE 染色標本を病理学的に再評価し、凍結組織または FFPE を用いて p53 のタンパク発現、DNA 損傷(DNA double strand breaks)の指標となる  $\gamma$ H2AX などの発現解析を免疫組織化学染色で行う。癌組織の凍結切片または FFPE を用いて gDNA を抽出し、NGS を用いて大腸癌関連遺伝子(RAS, BRAF, PIK3CA, TP53 など)の変異解析を行う。エピジェネティックな変化としての DNA メチル化異常についても同様に解析する。これによって同一癌組織における腸内細菌叢組成と分子異常の関連性を明らかにすることが可能になる。

#### 発癌・進展の「鍵」となる細胞集団の同定のための単一細胞レベルでの解析

腸内細菌叢だけでなく癌自体や癌微小環境における microbiome、さらにはその不均一性(heterogeneity)が発癌・進展や治療抵抗性に関与している可能性がある。切除直後の新鮮組織を用いて、10xGENOMICS 社の Chromium シングルセルコントローラーによる single cell RNA sequence (scRNAseq) 解析を行う。単一細胞レベルでのシーケンス解析により、細胞集団における網羅的遺伝子発現プロファイルから、機能別クラスタリングが可能となりその不均一性が明らかとなる。通常 ACS 経路の癌と *de novo* 癌においては微小環境含めて細胞集団が異なることが推測され、上記で得られた情報と合わせて多方面から総合的に比較解析し、*de novo* 大腸癌発癌経路を明らかにする。

#### 4. 研究成果

上記方法・計画のうちまだ一部のみの遂行段階である。また、本研究の主題である *de novo* 癌症例数が少なく、少し方向性を変更して広く家族性大腸腺腫症(FAP)由来や炎症性腸疾患由来大腸癌患者・組織での解析を行っている。FAP に関しては、scRNAseq 解析のため、手術を行った FAP 由来大腸癌の患者の摘出標本から、腫瘍部、腺腫非密生部、腺腫密生部、正常粘膜部、リンパ節を採取し単一細胞懸濁液作成、ライブラリー作成を行った。現在、検体採取部位別に比較しながら、上皮細胞、腫瘍微小環境構成細胞について解析を進めている。さらに通常型大腸癌の public data との比較を行い検討している。scRNA-seq を施行した結果、44550 個の細胞の遺伝子発現データが得られ、クラスタリングにより 22 個の細胞集団が同定された。既知のマーカー遺伝子を用いて cell type を同定した。腫瘍微小環境のうち特に fibroblast に着目し、fibroblast のみを再クラスタリングしたところ、4 つのクラスターが同定された。それらを検体採取部位別に比較すると、Fibroblast は癌部に多く認められ、癌部では正常部と比較して myofibroblasts が多く inflammatory fibroblasts が少なかった。腺腫部にも同様の傾向が認められた。また、colitic cancer 患者の解析も同様に進めている。下記、図 1 の様に免疫関連細胞群とさらに詳細な遺伝子発現解析も進めている。



大腸癌のCD8+ Tcellのサブクラスター分類とcytotoxicity関連遺伝子の発現

上述の細菌叢解析や scRNAseq 解析の実験手技・解析方法は確立されつつある。大腸癌患者の便サンプルはすでに数例は microbiome 解析に提出中であり、結果が判明次第、詳細な解析を行う予定である。また、結果によっては手術検体からの DNA 抽出、細菌叢解析を行う予定である。

scRNAseq 解析についても、引き続き癌そのものだけでなく癌微小環境の heterogeneity についてさらに追求する。解析にて治療抵抗性や癌免疫寛容などに関わる細胞集団が同定できれば、同定した細胞集団と癌細胞との相互作用や、細胞集団が癌細胞の遊走・浸潤能をはじめとする浸潤、転移に及ぼす影響などを in vitro, in vivo 実験で検証できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久野恭子、水内祐介、大内田研宙、堤親範、中村祥一、奥田翔、大坪慶志輝、寅田信博、佐田政史、田村公二、永吉絹子、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、中村雅史
2. 発表標題 Single cell RNA sequenceを用いた家族性大腸腺腫症各がん段階のCD4+ Tcellの比較
3. 学会等名 JDDW2022(第30回日本消化器関連学会週間)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久野恭子、大内田研宙、水内祐介、堤親範、中村祥一、奥田翔、大坪慶志輝、寅田信博、佐田政史、田村公二、永吉絹子、池永直樹、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 Single cell RNA sequenceを用いた家族性大腸腺腫症発癌過程におけるCD8+Tcellの解析
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------