

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K09277

研究課題名(和文) 口腔内細菌およびプロバイオティクス由来活性物質による新規食道癌予防・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel preventive and therapeutic substance derived from oral flora or probiotics

研究代表者

盛一 健太郎 (Moriichi, Kentaro)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70455715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌群とコントロール群から食道粘膜と唾液を採取，菌叢解析にて食道癌で発現の多い菌種を抽出した．この菌種と食道癌との関連性の報告があるFusobacterium Nucleatumも入手済みであり，今後細胞動態への影響を検討する．フェリクロームの食道癌細胞株への抗腫瘍効果を認めDDIT3 mRNA, Cleaved PARP, Cleaved caspase-9, p-p53のタンパク発現増加を認め，その機序を解析中である．マウスxenograftモデルでもフェリクローム投与群で腫瘍が有意に縮小した．以上から，フェリクロームは腫瘍細胞にアポトーシスを誘導し発育を抑制している事が示唆された．

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では，食道癌に関連が疑われる細菌の絞り込みを行い，その効果について検証中である．腫瘍の増殖活性に影響する場合，細菌やその産生物質が治療ターゲットとなり得るため，新規の治療法確立につながる．また，フェリクロームの抗腫瘍効果が食道癌でもin vivoで示されたことから，フェリクローム自体の治療への応用だけでなく，解析中のシグナルが明らかになれば，シグナル関連分子も治療ターゲットとなり，食道癌に対する治療選択が大きく広がる事が予想される．

研究成果の概要(英文)：Biopsy specimens and saliva were obtained from the patients with esophageal cancer or healthy volunteers. Bacterial flora of each sample was analyzed and then bacteria increased in cancer patients were selected. The effects of these bacterial strain on cell kinetics are being analyzed. Anti-tumor effect of Ferrichrome on esophageal cancer cell lines was confirmed. Ferrichrome upregulated the expressions of DDIT3 mRNA, Cleaved PARP, Cleaved caspase-9 and phospho-p53. Further, the mechanisms of regulating these alterations are being investigated. In vivo effects of Ferrichrome were also confirmed using mouse xenograft model. These results indicated that Ferrichrome inhibited tumor growth through inducing apoptosis in tumor cell.

研究分野：消化器内科

キーワード：食道癌 プロバイオティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食道癌の発症には喫煙と飲酒、肥満などの危険因子に加え、歯周病などの口腔内衛生環境やプロバイオティクス摂取の関与が示唆されている。しかし、食道癌の発育・進展を促進あるいは抑制する細菌やその菌由来産生物質については明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、食道癌患者に特有な口腔内細菌叢の同定、食道癌患者で増減している口腔内細菌やプロバイオティクスの培養上清の食道癌細胞に対する作用の解明、これら培養上清から食道癌を促進あるいは抑制する菌由来物質の同定、これまでに同定されたプロバイオティクス由来物質の抗腫瘍効果の同定、を目的とする。本研究により食道癌治療の新規標的となる菌由来抗腫瘍分子や、菌由来抗腫瘍物質を用いた新規治療開発の基盤的成果が期待される。

3. 研究の方法

(1) 菌叢解析

食道癌群からは内視鏡により食道癌部と正常食道粘膜部から、口腔内唾液は綿棒で採取、コントロール群では、正常食道粘膜と口腔内唾液を同様に採取した。ゲノム DNA 抽出と 16SrRNA 遺伝子アンプリコン調製のうえ、アンプリコンシークエンシングによる菌叢解析を施行した。生検組織は半量程度を分取して QIAamp DNA mini キットを用い、唾液綿棒拭い液は 200 μ l を分取して標準キットにてゲノム DNA 抽出を行った。調製した DNA は Qubit 蛍光試薬により DNA 濃度を測定した。調製した DNA (10ng in 20 μ l 反応液) を鋳型にタグ付きユニバーサルプライマーで 16SrRNA 遺伝子領域を PCR 増幅したところ、解析に必要十分量の DNA が確認された。PCR アンプリコンの電気泳動では唾液 2 検体はシャープなバンド、生検 3 検体はスミアなバンド(ホストゲノムの混入による影響の可能性)の PCR アンプリコンが得られた。本アンプリコンを用いて MiSeq 次世代シーケンサーにて配列解析を行った。得られた配列をプリプロセス後、フローラジェネシスソフトウェアによる配列のグループクラスター化、細菌種類アサインと系統解析を実施した。

(2) プロバイオティクス由来の抗腫瘍活性物質フェリクロームの食道癌に対する抗腫瘍効果評価と作用機序解析
これまでに我々が明らかにしてきたフェリクロームの抗腫瘍作用(Konishi H, Nat Commun. 2016) が食道癌に対しても有用か検討するとともに、有用な場合はその作用機序の解析を行う。

抗腫瘍効果評価

in vitroでの検討

食道腺癌細胞株の OE19, OE33, 食道扁平上皮癌細胞株の KYSE70 に対しフェリクロームを添加して SRB assay で細胞増殖活性を評価する。

in vivoでの検討

in vitro の結果を基に、最も感受性の高い細胞株を用いてマウス xenograft モデルを作成して、フェリクローム投与の有無で腫瘍体積・重量を比較する。

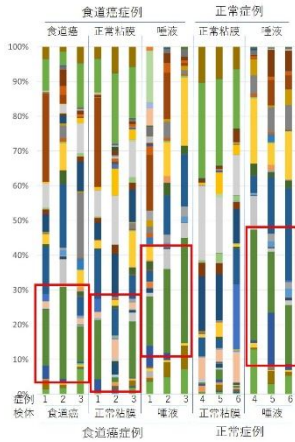
抗腫瘍機序の解析

フェリクローム投与による細胞株の増殖能及びアポトーシスについて Ki-67 免疫組織染色および TUNEL 染色で評価する。さらに我々の既報の胃癌細胞株の検討と同様にアポトーシス転写促進因子 DDIT3 の mRNA の発現について qPCR で評価する。さらにフェリクローム添加の有無で Cleaved PARP, Cleaved caspase-9, P-p53, p53 について Western blotting 法で評価を行う。抗腫瘍効果に関連するシグナルの検索は transcriptome 解析を行う。

4. 研究成果

(1) 菌叢解析

- ・クラスター分類の結果、490 の細菌クラスターに分類された。
- ・細菌クラスター全体では 57.8% に当たる 283 クラスターが、各サンプルレベルでは 34 ~ 59% のクラスターの細菌種アノテーション付与がなされた。



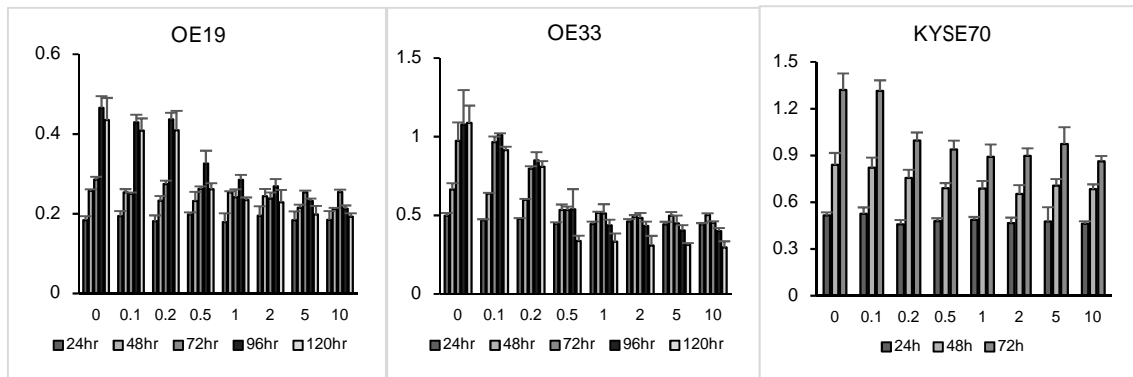
採取した検体を左のように群別に family レベルでの菌叢解析を行った。食道癌症例の食道癌粘膜および正常粘膜，唾液と正常症例の唾液中には赤枠で囲んだ family level も菌種を認めなかった。このことから，食道癌発生に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。現在この family に属する菌株を購入して，食道癌細胞株を用いて増殖活性に影響するか検討中である。

(2) プロバイオティクス由来の抗腫瘍活性物質フェリクロームの食道癌に対する抗腫瘍効果評価と作用機序解析

抗腫瘍効果評価

*in vitro*での検討

食道腺癌細胞株の OE19, OE33, 食道扁平上皮癌細胞株の KYSE70 に対してフェリクロームの濃度を変えて添加後 24 時間, 48 時間, 72 時間, 96 時間, 120 時間後の増殖活性について SRB assay で評価した。いずれの細胞株でも増殖抑制効果を認めた。



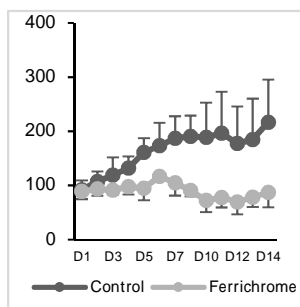
*in vivo*での検討

OE33 を用いたマウスに対して xenograft モデルを作成して，フェリクローム投与群と control 群で腫瘍体積と質量を測定したところ，フェリクローム群において Day5 以降で腫瘍体積が有意に小さく，腫瘍質量も有意に軽い結果であった。

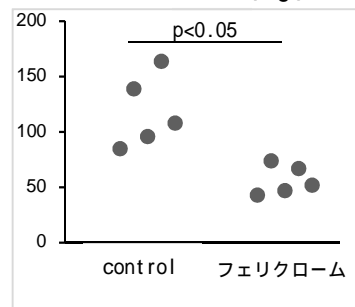
control フェリクローム



腫瘍体積



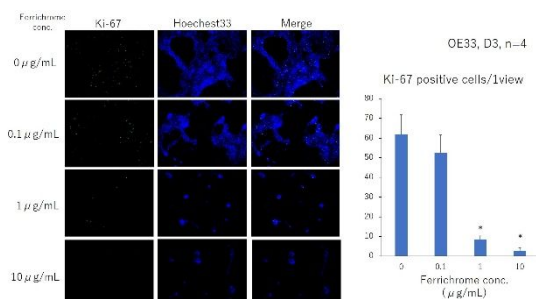
腫瘍質量 (mg)



抗腫瘍機序の解析

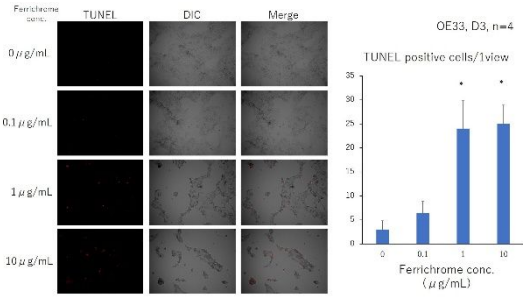
・Ki-67 免疫組織染色

右図のように OE33 に対してフェリクロームの濃度を調整して添加後 4 日に細胞免疫染色を施行した。1 視野あたりの Ki-67 陽性細胞数はフェリクローム濃度が 1μg/ml, 10μg/ml で有意に低下を認めた。



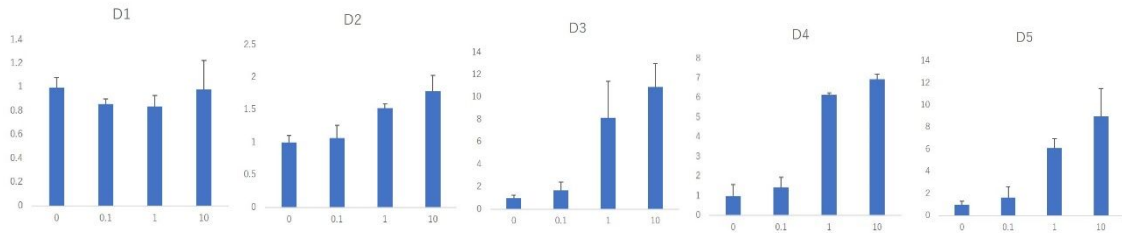
• TUNEL 染色

Ki-67 と同様に OE33 に対してフェリクロームの濃度を調整して添加後 4 日に TUNEL 染色を施行した。1 視野あたりの TUNEL 染色陽性細胞数はフェリクローム濃度が 1 μ g/ml, 10 μ g/ml で有意に増加を認めた。



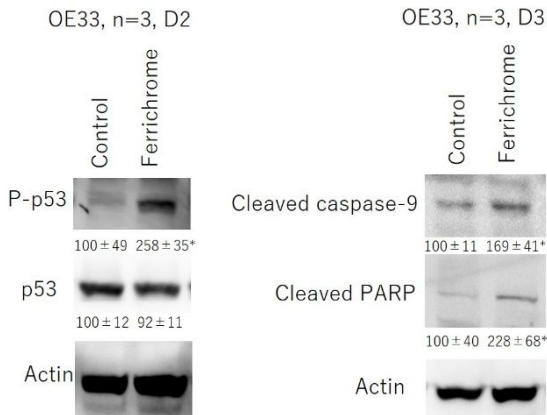
• DDIT3 mRNA expression 変化

下図のように OE33 に対してフェリクロームの濃度を調整してフェリクロームを投与して Day1~5 までの DDIT3 mRNA 発現について qPCR で評価したところ Day 2 以降にフェリクローム濃度が 1 μ g/ml, 10 μ g/ml で DDIT3 mRNA の発現が亢進していた。



• Cleaved PARP, Cleaved caspase-9, P-p53, p53 発現変化

Cleaved PARP, Cleaved caspase-9, P-p53, p53 のフェリクローム添加の有無によるタンパク発現の変化について、下図のように Western blotting 法で評価を行った。



結果のまとめ

菌叢解析では、正常症例（健常例）の食道粘膜に発現を認めない菌種（family level）があり、食道癌と関連している可能性がある。現在この菌種が細胞動態にどのような影響を与えるかについて検討中である。

フェリクロームの抗腫瘍作用について食道腺癌細胞株の OE19, OE33, 食道扁平上皮癌細胞株の KYSE70 に対し増殖活性を検討したところ、全ての細胞株で増殖能は低下を示しており、フェリクロームの抗腫瘍効果は食道癌細胞株に対しても有効であった。in vivo の検討では OE33 を用いたマウス xenograft モデルを作成して、フェリクローム投与の有無で腫瘍体積・重量を比較したところ、フェリクローム投与群が有意に低い結果となった。フェリクロームを添加した OE33 に対して ki-67 および TUNEL 染色を行ったところ、それぞれ有意に低下、増加を認めた。また、既報の胃癌細胞株の検討と同様にアポトーシス転写促進因子 DDIT3 の mRNA の発現も増加を認めた。フェリクローム添加の有無で OE33 の Cleaved PARP および Cleaved caspase-9, P-p53, p53 について Western blotting 法で評価したところ、p53 以外はいずれもフェリクローム添加群で有意に発現上昇を認めた。以上から、フェリクロームは腫瘍細胞にアポトーシスを誘導することで、増殖を抑制している可能性が示唆された。現在、transcriptome 解析を行いシグナルについても解析中である。

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	上野 伸展 (Ueno Nobuhiro) (30436000)	旭川医科大学・医学部・特任講師 (10107)	
研究分担者	藤谷 幹浩 (Fujiya Mikihiro) (80322915)	旭川医科大学・医学部・教授 (10107)	

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