

令和元年6月21日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09331

研究課題名(和文) 潰瘍性大腸炎合併癌における粘膜付随細菌叢の網羅的解析

研究課題名(英文) Analysis of mucosa-associated bacteria in ulcerative colitis-associated cancer

研究代表者

光山 慶一 (Mitsuyama, Keiichi)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：20200066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎の癌化機序を明らかにする目的で、粘膜付随細菌叢とインターロイキン6 トランスシグナリングとの関連を検討した。FISHとLMD-16S遺伝子メタゲノム解析法を用いて、潰瘍性大腸炎合併大腸癌の腸粘膜には多数の粘膜付随細菌叢が存在することを明らかにした。次に潰瘍性大腸炎合併大腸癌の腸粘膜でのインターロイキン6 トランスシグナリングの活性化を示した。最後に、潰瘍性大腸炎合併大腸癌とsporadic大腸癌での粘膜付随細菌叢とインターロイキン6 トランスシグナリングを比較検討し、潰瘍性大腸炎合併大腸癌における腸内細菌によるインターロイキン6 トランスシグナリングの活性化を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、潰瘍性大腸炎患者の急増とともに、潰瘍性大腸炎長期経過例に合併する大腸癌が増加傾向にあり、その予防対策が急務である。潰瘍性大腸炎の癌化メカニズムはまだ不明だが、腸内細菌と粘膜免疫の相互作用が密接に関与している可能性が示唆されている。本研究では、腸粘膜内に棲息する細菌と腸粘膜内のサイトカインネットワークとの関連を検討し、腸粘膜内に棲息する細菌による免疫細胞でのインターロイキン6 トランスシグナリングの活性化が潰瘍性大腸炎の癌化に関与していることが示唆された。本研究の結果から、潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢の是正が潰瘍性大腸炎の癌化予防や治療へとつながっていくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of carcinogenesis in ulcerative colitis, we examined the relationship between the mucosa-associated bacteria and interleukin-6 transsignaling. Using FISH and LMD-16S gene metagenomic analysis, we found various mucosa-associated bacteria in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis-associated colon cancer. We also observed the activation of interleukin-6 transsignaling in the colonic mucosa. Finally, we compared mucosa-associated bacteria and interleukin-6 transsignaling in sporadic colon cancer and ulcerative colitis-associated colon cancer and found the highly activation of interleukin-6 transsignaling by enteric bacteria in the colon of patients with ulcerative colitis-associated colon cancer.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：潰瘍性大腸炎合併大腸癌 粘膜付随細菌叢 インターロイキン6 トランスシグナリング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、UC患者の急増とともに、UCの長期経過例に合併する大腸癌(UC合併癌)が増加傾向にあり、その対策が急務である。UCの癌化機序はまだ不明だが、腸内細菌と粘膜免疫の相互作用が密接に関与している可能性が示唆されている。

我々は、UCでの粘膜免疫の異常として interleukin (IL)-6 トランスシグナルの活性化が重要で、その選択的抑制剤である sgp130-Fc により UC の進展・癌化が制御できることを報告してきた。さらに動物モデルを用いた検討で、UC の進展・癌化でみられる IL-6 トランスシグナルの活性化は、腸内細菌が、マクロファージの TNF 変換酵素 (TACE) を刺激することによって生じることを見出した。

最近、UC 発症に腸内細菌叢の破綻 (dysbiosis) が関与することが明らかにされつつある。しかし、UC 発症後の長期経過中に合併する大腸癌に対する腸内細菌の関与については未知のままである。さらに、癌化過程における、腸内細菌と IL-6 トランスシグナルとの関連についても不明である。

UC 合併癌と腸内細菌の関連性を検討するには、現在主流である糞便細菌叢の解析では不十分で、癌部に存在する MACB の解析が重要なことが明らかにされつつある。実際、糞便細菌叢と粘膜付随細菌叢 (mucosa-associated commensal bacteria: MACB) とでは細菌叢の解離がみられることが報告されている。しかし、MACB の解析、特にホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織標本での網羅的解析は技術的に困難なため、ほとんど実施できないのが現状であった。

2. 研究の目的

新たに確立した手法を用いて、UC に合併する大腸癌 (UC 合併癌) の MACB を網羅的に解析する。併せて MACB と IL-6 トランスシグナルとの関連についても検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト MACB の解析法の確立

マウス FFPE 標本で取得した解析手技を用いて、ヒト FFPE 標本での MACB 解析法を確立する。標本には、手術または生検時に病理検査のために採取されたものを使用する。

FFPE 組織切片の作製：大腸組織を 10%ホルマリン緩衝液に入れ、1時間室温で固定する。固定液を交換した後、一昼夜、追加固定する。固定液に入れた組織は、パラフィン包埋に至るまで 4℃ で保存する。固定標本を自動パラフィン包埋装置で処理する前日に、一昼夜、水洗する。ユング型マイクロトームを用いて、6mm の FFPE 組織切片を作製する。標本は、カルツァイス社製 LMD 装置 (PALM MicroBeam IV) に供するため、MembraneSlide 1.0 PEN (カルツァイス社製) 上に伸展させる。FFPE 組織切片は、LMD 装置に供するまで -80℃ で保存する。

LMD 装置を用いた FFPE 組織切片からの組織分離と DNA 抽出法：FFPE 組織切片を脱パラフィン後 (キシレン:5分 X2回、100% エタノール:1分 X2回、70% エタノール:1分)、ドライヤーで風乾する。FFPE 組織切片から LMD 装置を用いて、大腸粘膜組織 (約 500, 000 mm²) を切り出し、adhesiveCap 500 clear チューブ (カルツァイス社製) を用いて回収する。単離した組織から QIAamp DNA micro kit (QIAGEN 社製) の手法に若干の変更を加え、DNA を抽出する。NanoDrop 装置で DNA 濃度の測定を行なう

細菌 16S DNA 遺伝子増幅の確認：域の遺伝子増幅を PCR 法で実施する。アガロースゲル電気泳動後のエチジウムブロマイド染色で遺伝子増幅を確認する。また、SYBER® Premix Ex Taq™ (Takara 社製) を用いて V4 領域の遺伝子増幅をリアルタイム PCR 法で検出する (ABI-7500 アプライドバイオシステム社製)。

FFPE 組織標本と凍結組織標本との比較：FFPE 組織切片と凍結組織切片から調製した DNA を用いた細菌 16S rDNA 遺伝子メタゲノム解析結果を比較することにより、MACB の解析において FFPE 組織切片を用いる妥当性について確認する。

(2) 免疫組織化学的染色の至適条件の確立

免疫組織化学的手法による、IL-6 トランスシグナル関連因子 (IL6 受容体、gp130、IL-6、STAT3、TACE 等) の染色の至適条件を決定する。

(3) UC 合併癌での MACB の解析

UC 合併癌組織から作製した FFPE 標本を用いて LMD-16S 遺伝子メタゲノム解析法で MACB の菌叢構成を多数の症例で解析する。対照として、UC 合併癌の非癌部組織、UC 組織、一般大腸癌組織、一般大腸癌の非癌部組織を用いる。

(4) UC 合併癌での IL-6 トランスシグナルの解析

UC 合併癌組織の FFPE 標本を用いて免疫組織化学的手法により、IL-6 トランスシグナル関連因子 (IL6 受容体、gp130、IL-6、STAT3、TACE 等) の発現を多数の症例で解析する。対照として、

UC 合併癌の非癌部組織、UC 組織、一般大腸癌組織、一般大腸癌の非癌部組織を用いる。

(5)UC 合併癌 MACB と IL-6 トランスシグナルの関連性の統計学的解析

- ・ UC 合併癌組織と各種対照組織 (UC 合併癌の非癌部組織、UC 組織、一般大腸癌組織、一般大腸癌の非癌部組織) での MACB を比較検討し、UC 合併癌に特異的な MACB の構成を解析する。
- ・ UC 合併癌組織と各種対照組織 (UC 合併癌の非癌部組織、UC 組織、一般大腸癌組織、一般大腸癌の非癌部組織) での IL-6 トランスシグナル関連因子 (IL6 受容体、gp130、IL-6、STAT3、TACE 等) を比較検討し、UC 合併癌に特異的な IL-6 トランスシグナルの経路を解析する。
- ・ UC 合併癌組織において、MACB と IL-6 トランスシグナルの関連を検討する。

4. 研究成果

まず蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) と LMD-16S 遺伝子メタゲノム解析法の 2 種類の手法を用いて、UC の癌化に關与する MACB の検討を行った。その結果、潰 UC 患者の腸粘膜には、多数の MACB が存在することを明らかにした。

次に大腸癌やクローン病での粘膜付随細菌叢を検討し UC との比較を行うとともに、IL-6 トランスシグナリングの関連因子 (IL-6 受容体、gp130、インターロイキン 6、STAT3、腫瘍壊死因子変換酵素 等) との関連を検討した。

さらに、UC 合併大腸癌および sporadic 大腸癌での MACB の検討を行うとともに、IL-6 トランスシグナリングの関連因子との関連を検討した。その結果、UC 合併大腸癌での IL-6 トランスシグナリングの活性化が明らかとなった。

本研究によって、腸粘膜内に棲息する細菌による免疫細胞での IL-6 トランスシグナリングの活性化が UC の癌化に關与していることが示唆され、UC 患者の腸内細菌叢の是正が UC の癌化予防や治療へとつながっていくことが期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

Hirai F, Ishida T, Takeshima F, Yamamoto S, Yoshikawa I, Ashizuka S, Inatsu H, Mitsuyama K, Sou S, Iwakiri R, Nozaki R, Ohi H, Esaki M, Iida M, Matsui T, Effect of a concomitant elemental diet with maintenance anti-tumor necrosis factor-alpha antibody therapy in patients with Crohn's disease: A multicenter, prospective cohort study, Journal of gastroenterology and hepatology, 査読有、34 巻、2019、132-139、DOI: 10.1111/jgh.14361

Araki T, Arinaga-Hino T, Koga H, Akiba J, Ide T, Okabe Y, Kuwahara R, Amano K, Yasumoto M, Kawaguchi T, Sano T, Kondou R, Kurata S, Mitsuyama K, Torimura T., Marked accumulation of FDG and inflammatory cells expressing glucose transporter-3 in IgG4-related autoimmune hepatitis, Hepatology Research, 査読有、48 巻、2018、937-944、DOI:10.1111/hepr.13188

Yamauchi R, Araki T, Mitsuyama K, Tokito T, Ishii H, Yoshioka S, Kuwaki K, Mori A, Yoshimura T, Tsuruta O, Torimura T, The characteristics of nivolumab-induced colitis: an evaluation of three cases and a literature review, BMC Gastroenterology, 査読有、18 巻、2018、135、DOI:10.1186/s12876-018-0864-1

Maeyama Y, Mitsuyama K, Noda T, Nagata S, Nagata T, Yoshioka S, Yoshida H, Mukasa M, Sumie H, Kawano H, Akiba J, Araki Y, Kakuma T, Tsuruta O, Torimura T, Prediction of colorectal tumor grade and invasion depth through narrow-band imaging scoring, World Journal of Gastroenterology, 査読有、24 巻、2018、4809-4820、DOI:10.3748/wjg.v24.i42.4809

Nagata S, Mitsuyama K, Kawano H, Noda T, Maeyama Y, Mukasa M, Takedatsu H, Yoshioka S, Kuwaki K, Akiba J, Tsuruta O, Torimura T, Endoscopic analysis of colorectal serrated lesions with cancer, Oncology Letters, 査読有、15 巻、2018、8655-8662、DOI:

10.3892/ol.2018.8386.

Fukunaga S, Takedatsu H, Mitsuyama K, Torimura T, A Rare Case of Ulcerative Colitis with Neurofibromatosis Type 1, The Kurume Medical Journal, 査読有、64 巻、2018、25-27、DOI:10.2739/kurumemedj.MS00014

Takedatsu H, Mitsuyama K, Fukunaga S, Yoshioka S, Yamauchi R, Mori A, Yamasaki H, Kuwaki K, Sakisaka H, Sakisaka S, Torimura T, Diagnostic and clinical role of serum proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease, Journal of Gastroenterology and Hepatology, 査読有、2018、1603-1607、DOI:10.1111/jgh.14140

Fukunaga S, Kuwaki K, Mitsuyama K, Takedatsu H, Yoshioka S, Yamasaki H, Yamauchi R, Mori A, Kakuma T, Tsuruta O, Torimura T, Detection of calprotectin in inflammatory bowel disease: Fecal and serum levels and immunohistochemical localization, International Journal of Molecular Medicine, 査読有、41 巻、2018、107-118、DOI:10.3892/ijmm.2017.3244

Naganuma M, Sugimoto S, Mitsuyama K, Kobayashi T, Yoshimura N, Ohi H, Tanaka S, Andoh A, Ohmiya N, Saigusa K, Yamamoto T, Morohoshi Y, Ichikawa H, Matsuoka K, Hisamatsu T, Watanabe K, Mizuno S, Suda W, Hattori M, Fukuda S, Hirayama A, Abe T, Watanabe M, Hibi T, Suzuki Y, Kanai T; INDIGO Study Group, Efficacy of Indigo naturalis in a Multicenter Randomized Controlled Trial of Patients with Ulcerative Colitis, Gastroenterology, 査読有、154 巻、2018、935-947、DOI:10.1053/j.gastro.2017.11.024

Fukunaga S, Takedatsu H, Muta H, Mitsuyama K, Torimura T, An unusual cause of colonic stricture with polyps. Gut, 査読有、66 巻、2017、1495、DOI:10.1136/gutjnl-2016-312737

Yoshioka S, Takedatsu H, Fukunaga S, Kuwaki K, Yamasaki H, Yamauchi R, Mori A, Kawano H, Yanagi T, Mizuochi T, Ushijima K, Mitsuyama K, Tsuruta O, Torimura T, Study to determine guidelines for pediatric colonoscopy, World Journal Gastroenterol, 査読有、23 巻、2017、5773-5779、DOI:10.3748/wjg.v23.i31.5773

Yamauchi R, Kominato K, Mitsuyama K, Takedatsu H, Yoshioka S, Kuwaki K, Yamasaki H, Fukunaga S, Mori A, Akiba J, Tsuruta O, Torimura T, Stereomicroscopic features of colitis-associated tumors in mice: Evaluation of pit pattern, Oncology Letters, 査読有、14 巻、2017、3675-3682、DOI:10.3892/ol.2017.6645

〔学会発表〕(計 22 件)

1. 森田 俊、吉岡慎一郎、山崎 博、荒木俊博、吉村哲広、森 敦、山内亨介、桑木光太郎、鶴田 修、光山慶一、鳥村拓司、活動期潰瘍性大腸炎患者に対するブデソニド注腸フォーム剤の有用性の検討、第 9 回日本炎症性腸疾患学会学術集会、2018
2. 吉岡慎一郎、平井郁仁、江崎幹宏、荒木俊博、森田 俊、吉村哲広、森 敦、山内亨介、桑木光太郎、山崎 博、鶴田 修、光山慶一、鳥村拓司、各種腸疾患における ACP353(Anti-Crohn's disease peptide No.353)血中濃度の測定：多施設共同研究、第 9 回日本炎症性腸疾患学会学術集会、2018
3. 荒木俊博、山崎 博、森田 俊、吉村哲広、森 敦、山内亨介、桑木光太郎、吉岡慎一郎、小林 智、光山慶一、鳥村拓司、ラット TNBS 大腸潰瘍モデルにおける自己組織化ハイドロ

ゲルの有用性の検討、第9回日本炎症性腸疾患学会学術集会、2018

4. 吉村哲広、桑木光太郎、水落建輝、吉岡慎一郎、山内亨介、森 敦、森田 俊、荒木俊博、光山慶一、鳥村拓司、若年炎症性腸疾患患者における便中カルプロテクチンの有用性、第9回日本炎症性腸疾患学会学術集会、2018
5. 山崎 博、今井徹朗、荒木俊博、森田 俊、吉村哲広、森 敦、山内亨介、桑木光太郎、吉岡慎一郎、光山慶一、深水 圭、鳥村拓司、潰瘍性大腸炎に対する single-needle 法を用いた血球成分除去療法 (GCAP/LCAP) の有用性、第9回日本炎症性腸疾患学会学術集会、2018
6. 吉岡慎一郎、福永秀平、荒木俊博、森田 俊、吉村哲広、森 敦、山内亨介、桑木光太郎、岡部義信、光山慶一、鶴田 修、鳥村拓司、当院でのクローン病小腸病変診断マネージメントにおける小腸内視鏡検査の有用性、第112回日本消化器病学会九州支部例会 第106回日本消化器内視鏡学会九州支部例会 合同、2018
7. 山内亨介、荒木俊博、吉村哲広、森 敦、桑木光太郎、吉岡慎一郎、光山慶一、鶴田 修、鳥村拓司、Nivolumab 投与後に大腸炎が認められた当院3症例の検討、26th JDDW (第96回日本消化器内視鏡学会総会)、2018
8. 森 敦、吉岡慎一郎、山崎 博、荒木俊博、森田 俊、吉村哲広、福永秀平、山内亨介、桑木光太郎、鶴田 修、光山慶一、鳥村拓司、当院でゴリムマブを使用した潰瘍性大腸炎患者の臨床背景とその効果、26th JDDW (第60回日本消化器病学会大会) 2018
9. 吉岡慎一郎、光山慶一、荒木俊博、森田 俊、吉村哲広、森 敦、福永秀平、山内亨介、山崎 博、桑木光太郎、鶴田 修、荒木靖三、鳥村拓司、クローン病新規バイオマーカー ACP353 はインフリキシマブ治療と腸管切除に関連する、26th JDDW (第60回日本消化器病学会大会)、2018
10. 福永秀平、吉岡慎一郎、荒木俊博、森田 俊、吉村哲広、森 敦、山内亨介、桑木光太郎、秋葉 純、衣笠哲史、赤木由人、光山慶一、鶴田 修、鳥村拓司、当院で経験した炎症性腸疾患関連腫瘍の特徴とサーベイランス内視鏡の実際、第43回日本大腸肛門病学会九州地方会、第34回九州ストーマリハビリテーション研究会、2018
11. 山崎 博、今井徹朗、荒木俊博、森田 俊、吉村哲弘、森 敦、山内亨介、桑木光太郎、吉岡慎一郎、光山慶一、潰瘍性大腸炎に対するシングルニードル法を用いた GMA 療法についての検討、第13回九州消化器 GCAP 療法研究会、2018
12. 山内亨介、荒木俊博、吉村哲広、森 敦、桑木光太郎、吉岡慎一郎、光山慶一、鶴田 修、鳥村拓司、当院の炎症性腸疾患合併妊娠症例における治療と経過、第104回日本消化器病学会総会、2018
13. 荒木俊博、山内亨介、森 敦、福永秀平、吉岡慎一郎、鶴田 修、光山慶一、鳥村拓司、原発性肺癌に対するニボルマブ投与に起因したと考えられる大腸炎の一例、第110回日本消化器病学会九州支部例会、第104回日本消化器内視鏡学会九州支部例会 合同、2017
14. 光山慶一、吉岡慎一郎、鶴田 修、潰瘍性大腸炎におけるサーベイランス大腸内視鏡-ランダム生検と狙撃生検の比較を中心に、25th JDDW (第59回日本消化器病学会大会、第15回日本消化器外科学会大会 合同)、2017
15. 吉岡慎一郎、光山慶一、森 敦、福永秀平、山内亨介、桑木光太郎、竹田津英稔、秋葉 純、衣笠哲史、赤木由人、鶴田 修、鳥村拓司、サーベイランス内視鏡におけるヒト潰瘍性大腸炎 (UC) 関連腫瘍の詳細-マウス DSS 腸炎モデル関連腫瘍の特徴も含めて-、第109回日本消化器病学会九州支部例会、第103回日本消化器内視鏡学会九州支部例会 合同、2017
16. 荒木俊博、森 敦、福永秀平、山内亨介、山崎 博、吉岡慎一郎、有永照子、井出達也、光

山慶一、鶴田 修、鳥村拓司、B型肝炎ウイルス無症候性キャリアに発症した難治性潰瘍性大腸炎の一例、第109回日本消化器病学会九州支部例会、第103回日本消化器内視鏡学会九州支部例会 合同、2017

17. 福永秀平、桑木光太郎、光山慶一、竹田津英稔、吉岡慎一郎、山崎 博、山内亨介、森 敦、鶴田 修、鳥村拓司、炎症性腸疾患における便中カルプロテクチン測定の有用性、第109回日本消化器病学会九州支部例会、第103回日本消化器内視鏡学会九州支部例会 合同、2017
18. 吉岡慎一郎、竹田津英稔、光山慶一、森 敦、福永秀平、山内亨介、山崎 博、桑木光太郎、柳 忠宏、河野弘志、鶴田 修、鳥村拓司、当院における小児大腸内視鏡検査の現状-前処置や鎮静における実際と工夫-、第93回日本消化器内視鏡学会総会、2017
19. Fukunaga S, Kuwaki K, Mitsuyama K, Takedatsu H, Yoshioka S, Yamasaki H, Yamauchi R, Mori A, Tsuruta O, Torimura T, Detection of Calprotectin in Inflammatory Bowel Disease: Fecal and Serum Levels and Immunohistochemical Localization, DDW-2017(Meeting of the American Gastroenterological Association)(AGA)、2017
20. Yamasaki H, Mitsuyama K, Meifu S, Mori A, Yamauchi R, Fukunaga S, Kuwaki K, Yoshioka S, Torimura T, Expression of Transient Receptor Potential Channels in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Inflammatory Bowel Disease Patients, DDW-2017(Meeting of the American Gastroenterological Association)(AGA)、2017
21. 山内亨介、米湊 健、光山慶一、竹田津英稔、山崎 博、吉岡慎一郎、桑木光太郎、福永秀平、森 敦、秋葉 純、鶴田 修、鳥村拓司、マウス大腸炎関連腫瘍における実体顕微鏡を用いた観察：pit pattern の評価、第103回日本消化器病学会総会、2017
22. 山崎 博、森 敦、山内亨介、福永秀平、桑木光太郎、吉岡慎一郎、光山慶一、鳥村拓司、炎症性腸疾患患者の末梢血単核球における Transient receptor potential (TRP) チャネルの発現、第103回日本消化器病学会総会、2017

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。