

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10504

研究課題名(和文) 胃粘膜内のmicrobiomeと胃癌の悪性度に関する網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis for the association between microbiome in the gastric mucosa and malignant potential of gastric cancer

研究代表者

吉田 直矢 (YOSHIDA, Naoya)

熊本大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：60467983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、上部消化管腺癌におけるF. nucleatumの検出系をreal-time PCRで確立した。全115例(83.3%)中40症例(34.8%)においてF. nucleatumのnusG遺伝子が検出された。多数の臨床病理学的・分子生物学的因子に関して検討を行ったところ、いずれの因子においてもF. nucleatumの有無で有意な差は認められなかった。腫瘍の占拠部位、ピロリ感染の有無、免疫学的因子(CD8やFOXP3の浸潤細胞数)においても有意な差は認められなかった。予後にも有意差を見いだせなかった。上部消化管腺癌においてF. nucleatum有する腫瘍の特徴は見いだされなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

microbiomeは癌、肥満、炎症性腸疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患との関連が明らかにされ、注目を集めている研究の一つである。これまで我々は大腸癌患者では腸内細菌叢の中でFusobacteriumが健常人よりも多く生息し、Fusobacteriumが多い症例では予後が不良であることを解明した。今回、胃腺癌や食道胃接合部腺癌におけるFusobacteriumの有無が、臨床病理的・分子生物学的に、あるいは予後・再発に影響を与えるかについて検討したが、有意な差が得られなかった。上部消化管癌においてFusobacteriumは腫瘍の悪性化に関与していない可能性が高いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a detecting method of F. nucleatum, targeting nusG, using real-time PCR. We examined the clinicopathological, molecular characteristics, and prognostic effect of the tumor with F. nucleatum (+) tumors, compared to those without. In a total of 115 cases with gastroesophageal adenocarcinoma, F. nucleatum was detected in 40 cases (34.8%). We analyzed factors like gender, age, tumor location, H pylori infection status by gastroscopy, disease stage, PD-L1 expression on tumor cells, intra-/peri-tumoral CD8(+) lymphocyte infiltration, intra-/peri-tumoral FOP3(+) lymphocyte infiltration, EBV infection, MSI status, Ki-67 intensity, TP53 mutation, HER2 status, LINE-1 methylation level, and CpG methylator phenotype (by using MGMT, CHFR, and CDKN2A). However, there was no significant differences. We could not find any prognostic difference between the two, in disease-specific survival, time to recurrence, relapse-free survival, or overall-survival.

研究分野：消化器外科学、食道癌・食道胃接合部癌・胃癌、microbiome

キーワード：Fusobacterium F. nucleatum microbiome 胃癌 食道胃接合部癌 予後因子

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

1. 研究開始当初の背景

Microbiome とは人体に生存する微生物群とその遺伝子および代謝活性の総称である。人体においては、13 兆のヒト細胞が 130 兆の細菌細胞と共存しており、また、2 万のヒト遺伝子が、500 万～800 万の細菌遺伝子、いわゆる microbiome と共存している (Cho I et al. Nat Rev Genet. 2012)。近年、microbiome は癌、肥満、炎症性腸疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患など様々な疾患との関連が明らかにされ、注目を集めている研究の一つである。Microbiome は疾患の予防や治療、また様々なバイオマーカーとして有望なターゲットとなり得る可能性がある。様々な癌腫において、microbiome の変化が発癌、癌の進展に寄与することが報告されている。大腸の Microbiome の変化が上皮のバリア機構を破綻させ、慢性炎症により大腸癌の進展を促進することが報告された (Gallimore AM et al. N Eng J Med. 2013)。更に、In vivo で腸内細菌を変化させることで大腸癌の発生率が増加することが報告されている (Arthur JC et al. Science. 2012, Belcheva et al. Cell. 2014)。肝臓癌においては肥満による腸内細菌叢の変化が肝細胞癌の促進に寄与していることが報告されている (Yoshimoto et al. Nature 2013)。これまで、我々は大腸癌患者では腸内細菌叢のなかで Fusobacterium が健常人よりも多く生息していることを見出した。さらに、切除検体のパラフィン固定標本より microbiome の評価を行い、Fusobacterium が多い症例では大腸癌の予後が不良であることを解明し報告している。切除検体から microbiome の評価が可能であり、予後因子または癌治療のターゲットとして個別化治療のマーカーとして用いられることが期待される。胃癌においては Helicobacter pylori 感染が発癌の原因の一つであることは良く知られているが、胃粘膜の細菌叢の変化と胃癌の関係については未知な部分が多く、十分に解明されていない。本研究では、上部消化管腺癌における Fusobacterium Nucleatum に注目し、その臨床病理学的意義について検討することとする。

2. 研究の目的

上部消化管腺癌 (胃腺癌、食道胃接合部腺癌) 症例における Fusobacterium Nucleatum を検出し、その臨床病理学的特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

203 例の上部消化管腺癌の FFPE から DNA を抽出し、StepOnePlus™ Real Time PCR system (Applied Biosystems) を用いて Taqman probe 法にて細菌 DNA に共通の保存配列である 16S 配列を検出した。さらにその中で Fusobacterium Nucleatum の nusG 遺伝子を検出する。用いたプライマーの塩基配列を以下に示す (表 1)。Threshold に関しては 0.2 を採用した。

<表 1. 本研究で用いたプライマーの塩基配列>

Target		Nucleotide sequence (5'→3')	Size (bp)
Internal control (16S rDNA)	Forward	CGTCAGCTCGTGYCGTGAG	131
	Reverse	CGTCRTCCCRCTTCC	
	Probe	FAM-TTAAGTCCRYAACGAGCGCAACCC-BHQ1	
nusG gene of <i>Fusobacterium nucleatum</i> AccNo. GMHS1916	Forward	TTCAATAAAAGTGCGAGGTCAAG	100
	Reverse	TAACAACACATGCAGGTCAATGG	
	Probe	FAM-ACTCGAACCCCAACCTCGGTTT-BHQ1	

4. 研究成果

(1) Real-time PCR 法による Fusobacterium Nucleatum の検出

サンプルからの DNA 抽出が可能となった 138 例中 115 例 (83.3%) において 16S DNA が検出された。さらにこのうち 40 症例 (34.8%) において Fusobacterium Nucleatum の nusG 遺伝子が検出された。これら 40 症例を Fusobacterium Nucleatum 陽性とし、残りの 75 症例を陰性とし、臨床病理学的に検討することとした。

(2) Fusobacterium Nucleatum 検出の有無による臨床病理学的因子の比較解析

<表2. 臨床病理学的・分子生物学的因子の比較>

Clinicopathological feature ALL Stage		total	Fusobacterium		P (across subtypes)
			Negative	Positive	
Total No. of patients		115	75 (65%)	40 (35%)	
Gender	Female	25 (22%)	17 (23%)	8 (20%)	0.82*
	Male	90 (78%)	58 (77%)	32 (80%)	
Age at surgery (mean ± SD)		69.3±12.1	68.9±12.5	70.1±11.5	0.88
Body mass index (kg/m ²) (mean ± SD) *not all cases		22.7±3.2	22.7±3.4	22.8±2.9	0.80
Siewert classification	Type I	8 (7%)	5 (7%)	3 (7%)	0.84
	Type II	66 (57%)	41 (54%)	25 (63%)	
	Type III	7 (6%)	5 (7%)	2 (5%)	
	G	34 (30%)	24 (32%)	10 (25%)	
Barrett's esophagus	Absent	68 (78%)	43 (77%)	25 (81%)	0.79*
	Present	19 (22%)	13 (23%)	6 (19%)	
<i>Helicobacter pylori</i> *not all cases	Negative	4 (33%)	2 (40%)	2 (29%)	0.99*
	Positive	8 (67%)	3 (60%)	5 (71%)	
Disease stage	I	28 (24%)	20 (27%)	8 (20%)	0.69
	II	32 (28%)	21 (28%)	11 (27%)	
	III	44 (38%)	26 (34%)	18 (45%)	
	IV	11 (10%)	8 (11%)	3 (8%)	
Lymphatic invasion *not all cases	Absent	51 (48%)	34 (49%)	17 (46%)	0.84*
	Present	56 (52%)	36 (51%)	20 (54%)	
Adjuvant chemotherapy *not all cases	Absent	56 (67%)	38 (70%)	18 (60%)	0.35*
	Present	28 (33%)	16 (30%)	12 (40%)	
Recurrence *not all cases	Absent	69 (63%)	43 (60%)	26 (68%)	0.41*
	Present	41 (37%)	29 (40%)	12 (32%)	
PD-L1 tumor proportion score≥1 *not all cases	Absent	47 (85%)	30 (88%)	17 (81%)	0.46*
	Present	8 (15%)	4 (12%)	4 (19%)	
Intratumor CD8 counts (mean ± SD) *not all cases		306.5±225.4	309.1±191.2	302.2±278.3	0.38
Peritumor CD8 counts (mean ± SD) *not all cases		329.5±231.0	314.9±230.8	353.6±235.2	0.47
Intratumor FOXP3 counts (mean ± SD) *not all cases		157.2±97.3	173.2±106.7	130.6±74.4	0.24
Peritumor FOXP3 counts (mean ± SD) *not all cases		168.2±97.8	164.6±96.7	174.0±102.0	0.80
EBV status	Negative	114 (99%)	74 (99%)	40 (100%)	0.99*
	Positive	1 (1%)	1 (1%)	0	
MSI status (6markers)	MSI-High	11 (11%)	5 (8%)	6 (18%)	0.31
	MSI-Low	3 (3%)	2 (3%)	1 (3%)	
	MSS	83 (86%)	57 (89%)	26 (79%)	
TP53 NGS status 2 *not all cases	Mutation	33 (57%)	20 (54%)	13 (62%)	0.59*
	WT	25 (43%)	17 (46%)	8 (38%)	
Ki-67 positivity	0-9%	1 (2%)	1 (3%)	0	0.59
	10-29%	7 (12%)	6 (16%)	1 (5%)	
	30-49%	10 (17%)	7 (18%)	3 (14%)	
	50-79%	30 (50%)	18 (47%)	12 (57%)	
	80-100%	11 (19%)	6 (16%)	5 (24%)	
HER2 IHC≥ 3+ and 10% *not all cases	Absent	54 (93%)	34 (92%)	20 (95%)	0.99*
	Present	4 (7%)	3 (8%)	1 (5%)	
LINE-1 methylation level (mean ± SD) *not all cases		65.6±8.8	66.3±8.6	64.3±8.9	0.37
EGJ-CIMP3 *not all cases	0	36 (45%)	24 (46%)	12 (41%)	0.94
	1	22 (27%)	14 (27%)	8 (28%)	
	2	9 (11%)	5 (10%)	4 (14%)	
	3	14 (17%)	9 (17%)	5 (17%)	

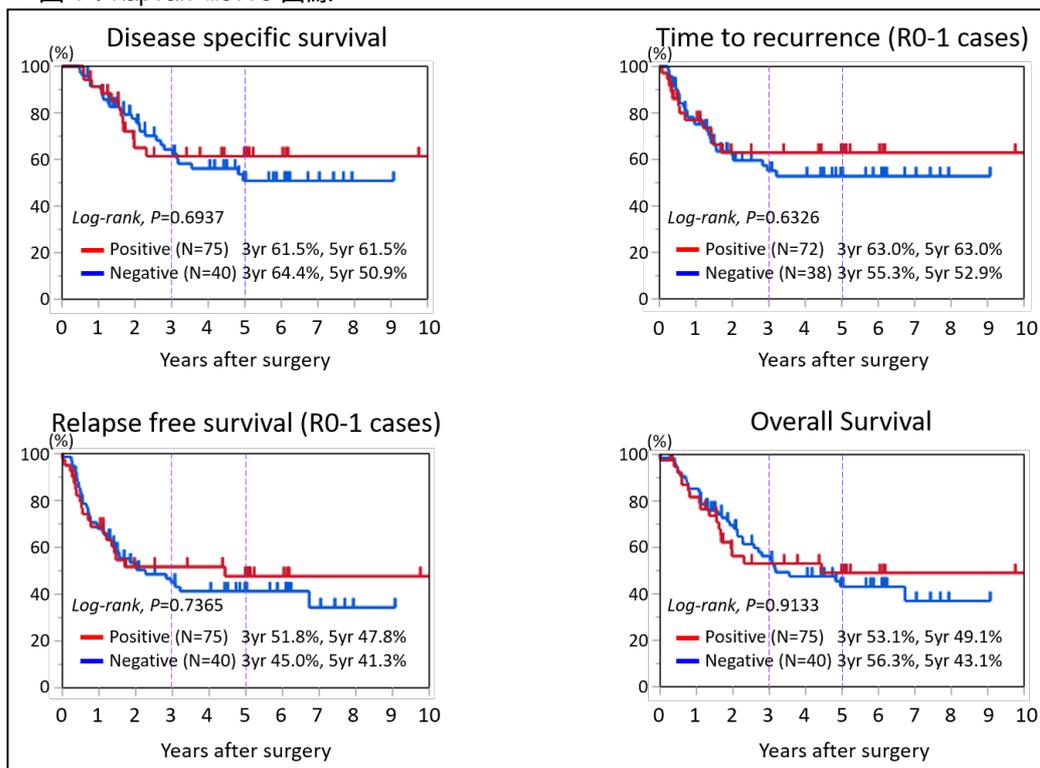
前頁表 2 に示すとおり、多数の臨床病理学的・分子生物学的因子に関して比較検討を行ったところ、いずれの因子においても *Fusobacterium Nucleatum* の有無で有意な差は認められなかった。当初注目していた腫瘍の占拠部位、ヘリコバクターピロリ感染の有無や、免疫学的因子(CD8 や FOXP3 の浸潤細胞数) においても有意な差は認められなかった(表 2)。

(3) 予後解析

Disease-specific survival (疾患特異的生存率)

術後 - 再発期間 (Time to recurrence)、Relapse-free survival (無再発生存率)、overall-survival (全生存期間) のいずれにおいても *Fusobacterium Nucleatum* 検出の有無別に有意な差は認められなかった(図 1)。

< 図 1 . Kaplan-Meire 曲線 >



また、再発部位による検討も行ったが、*Fusobacterium Nucleatum* 陽性腫瘍に特徴的な再発部位は認めなかった(表 3)。

< 表 3. 再発部位の検討 >

Factors	Total No.	<i>Fusobacterium</i>		P
		Negative	Positive	
	115	75 (65%)	40 (35%)	
The first site of recurrence (except R2 cases)				
Liver	12 (29%)	7 (24%)	5 (42%)	
Peritoneum	12 (29%)	10 (34%)	2 (17%)	
Lung	3 (7%)	2 (7%)	1 (8%)	
Bone	2 (5%)	2 (7%)	0	
Adrenal	0	0	0	
Brain	0	0	0	
Anastomosis	3 (7%)	1 (3%)	2 (17%)	
Pleural	0	0	0	
Other	2 (5%)	1 (3%)	1 (8%)	
Lymph node	12 (29%)	7 (24%)	5 (42%)	
Cervical LN	0	0	0	
Mediastinal LN	5 (12%)	3 (10%)	2 (17%)	
Paraortic LN	4 (10%)	2 (7%)	2 (17%)	
Abdominal LN	3 (7%)	2 (7%)	1 (8%)	
Unknown	1 (2%)	1 (3%)	0	

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

- Imamura Y, Watanabe M, Toihata T, Takamatsu M, Kawachi H, Haraguchi I, Ogata Y, Yoshida N, Saeki H, Oki E, Taguchi K, Yamamoto M, Morita M, Mine S, Hiki N, Baba H, Sano T. Recent Incidence Trend of Surgically Resected Esophagogastric Junction Adenocarcinoma and Microsatellite Instability Status in Japanese Patients. *Digestion*. 2019;99(1):6-13. doi: 10.1159/000494406、[査読有](#)
- Liu Y, Baba Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, Hiyoshi Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Wu R, Baba H. Progress in characterizing the linkage between *Fusobacterium nucleatum* and gastrointestinal cancer. *J Gastroenterol*. 2019;54(1):33-41. doi: 10.1007/s00535-018-1512-9、[査読有](#)
- Baba Y, Iwatsuki M, Yoshida N, Watanabe M, Baba H. Review of the gut microbiome and esophageal cancer: Pathogenesis and potential clinical implications. *Ann Gastroenterol Surg*. 2017;1:99-104. doi: 10.1002/ags3.12014、[査読有](#)
- Yamamura K, Baba Y, Miyake K, Nakamura K, Shigaki H, Mima K, Kurashige J, Ishimoto T, Iwatsuki M, Sakamoto Y, Yamashita Y, Yoshida N, Watanabe M, Baba H. *Fusobacterium nucleatum* in gastroenterological cancer: Evaluation of measurement methods using quantitative polymerase chain reaction and a literature review. *Oncol Lett*. 2017;14:6373-6378. doi: 10.3892/ol.2017.7001、[査読有](#)
- Mima K, Ogino S, Nakagawa S, Sawayama H, Kinoshita K, Krashima R, Ishimoto T, Imai K, Iwatsuki M, Hashimoto D, Baba Y, Sakamoto Y, Yamashita YI, Yoshida N, Chikamoto A, Ishiko T, Baba H. The role of intestinal bacteria in the development and progression of gastrointestinal tract neoplasms. *Surg Oncol*. 2017;26:368-376. doi: 10.1016/j.suronc.2017.07.011、[査読有](#)
- Mima K, Nakagawa S, Sawayama H, Ishimoto T, Imai K, Iwatsuki M, Hashimoto D, Baba Y, Yamashita YI, Yoshida N, Chikamoto A, Baba H. The microbiome and hepatobiliary-pancreatic cancers. *Cancer Lett*. 2017;402:9-15. doi: 10.1016/j.canlet.2017.05.001、[査読有](#)
- Yamamura K, Baba Y, Nakagawa S, Mima K, Miyake K, Nakamura K, Sawayama H, Kinoshita K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Sakamoto Y, Yamashita Y, Yoshida N, Watanabe M, Baba H. Human Microbiome *Fusobacterium Nucleatum* in Esophageal Cancer Tissue Is Associated with Prognosis. *Clin Cancer Res*. 2016;22:5574-5581. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1786、[査読有](#)

[学会発表](計 3 件)

- Baba Y, Li Y, Eto K, Hiyoshi Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H. Microbiome *Fusobacterium nucleatum* has an effect on chemotherapeutic response in esophageal squamous cell carcinoma. 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine, 2019
- 岩槻政晃、吉田直矢ほか、第 49 回胃病態機能研究会 一般演題、胃癌組織における *Fusobacterium nucleatum* の検出と臨床病理学的検討、2018
- 織田枝里、吉田直矢ほか、第 89 回日本胃癌学会総会 ポスター、胃癌組織における *F. nucleatum* の発現と予後との関係の検討、2017

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：今村 裕
ローマ字氏名：IMAMURA Yu
所属研究機関名：公益財団法人がん研究会
部局名：有明病院 消化器外科
職名：副医長
研究者番号(8桁)：70583045

研究分担者氏名：井田 智
ローマ字氏名：IDA Satoshi
所属研究機関名：公益財団法人がん研究会
部局名：有明病院 消化器外科
職名：副医長
研究者番号(8桁)：80583038

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

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。