

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18423

研究課題名(和文) 日米の消化器癌を用いたmicrobiome解析とエピゲノム異常・免疫応答との関連

研究課題名(英文) Microbiome analysis and the relation with epigenome abnormality and immune response using U.S. and Japanese gastrointestinal cancers

研究代表者

三橋 慧 (Mitsubishi, Kei)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70772127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：今回の検討でFusobacterium属は膵癌組織周囲の脂肪組織内に存在することが明らかとなった。またその陽性群は不良な生命予後との相関が認められたことからFusobacterium属が膵癌の生物学的悪性度に関与する可能性も示唆された。このように多症例の消化器癌を用いてゲノム解析で同定された微生物種とその分子異常、さらに環境因子との関連を検討することは、将来的に膵癌の新たな予防法や診断・治療法に繋がる可能性があり、消化器癌の新たな治療戦略を世界に先駆けて報告できるものと思われる。よって多種の消化器癌におけるmicrobiome解析の更なる発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Fusobacterium species were detected in pancreatic cancer tissue. Although no significant association was found between Fusobacterium species and molecular alterations of pancreatic cancers, the tumor Fusobacterium species status was independently associated with shorter survival of pancreatic cancer. Thus, our data suggest that tumor Fusobacterium species is a promising biomarker of pancreatic cancer and could open up exciting opportunities to improve our understanding of the pathogenesis of this fatal disease.

研究分野：消化器癌

キーワード：microbiome Fusobacterium 膵癌

1. 研究開始当初の背景

近年、網羅的遺伝子解析技術の進歩によりヒトの体内に膨大に存在する microbiome (生物環境を構成する微生物群ゲノムの総称) と各疾患の関連についての研究が急速に発展している。ヒトの体内にはヒトのゲノムの 10 倍以上の microbiome が存在するといわれており、その多くはヒトの腸管内に存在し、腸内細菌叢を構成していると考えられている。その中でも *Fusobacterium* 属は最近、大腸発癌との関連性が明らかとなり、マイクロサテライト不安定性大腸癌で特異的に高発現することが報告されている。一方、膵癌においては歯周病の原因菌と考えられている口腔内常在菌の *Porphyromonas gingivalis* がその発癌に関与することが近年明らかとなり、その感染経路として血流や経胆道によるルート、あるいは消化管から逆行性に菌が膵組織へ到達する可能性が示唆されている。このように大腸癌だけでなく、様々な消化器癌における microbiome の役割を明らかにすることは、その発癌メカニズムの解明だけでなく、サーベイランスや除菌治療など多岐にわたる分野において臨床応用可能と考えられる。しかしながら多症例の消化器癌臨床検体を用いた microbiome の検討は国内外を問わず、ほとんどなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

我々は最近、大腸癌の microbiome 解析において、共同研究先である米国のダナファーマー癌研究所と協力し、その Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) 標本を用いた最適な解析方法の開発に成功。この FFPE 標本を用いた方法によって、我々はより多くの臨床検体での microbiome 解析が可能になった(参照論文 2)。それに加え、解析できる対象が前癌病変や早期癌のような微小検体にまで広がったことは発癌早期におけるその役割を解明する上でも非常に重要であると思われる。

3. 研究の方法

今回、我々は札幌医科大学付属病院と関連施設で内視鏡的・外科的に切除された 1000 症例をこえる消化器癌(食道癌、胃癌、大腸癌、膵癌、胆管癌)を対象とした。それらの臨床検体(FFPE 標本)を用いて 16S rRNA シークエンス解析による微生物叢の同定を行った。さらに同定された菌に関しては生命予後や他の臨床病理学的因子、分子異常(遺伝子変異や DNA メチル化の異常、microRNA 発現等)との関連について検討した。

4. 研究成果

16S rRNA シークエンス解析の結果、腸管と口腔内の常在菌である *Fusobacterium* 属が同定され、消化器発癌に関与している可能性が考えられた。大腸癌組織における *Fusobacterium* 属はこれまでの凍結標本を用いたこれまでの報告とほぼ同じく、その 56% (286/511) で検出された。また欧米人の報告と同様に日本人の大腸癌でもマイクロサテライト不安定性 (MSI) 大腸癌で特異的に高発現することも明らかとなった ($P < 0.0001$) (参照論文 3)。またその他の消化器癌でも食道腺癌の 62% (40/65)、胃癌の 38% (78/208)、膵癌の 9% (25/283)、胆管癌の 15% (29/50) でそれぞれ *Fusobacterium* 属は同定された。膵癌組織での *Fusobacterium* 属の報告は皆無であったため、その存在部位を明らかにするために FISH 法を施行。その結果、*Fusobacterium* 属は膵癌組織の近傍の脂肪組織に認められることが明らかとなった。

また膵癌の分子異常に関する検討では KRAS 変異陽性は膵癌の 68%、MSI は 0%、CpG island methylator phenotype (CIMP) 陽性は 12%、miR-21 高発現は 40%、miR-31 高発現は 32% で認められたが、いずれも *Fusobacterium* 属との相関はなかった。一方、*Fusobacterium* 属の陽性群は不良な予後と有意な相関を示した (hazard ratio: 2.20; 95% confidence interval: 1.13–3.98; $P = 0.025$)。

今回の検討で *Fusobacterium* 属は膵癌組織周囲の脂肪組織内に存在することが明らかとなった。またその陽性群は不良な生命予後との相関が認められたことから *Fusobacterium* 属が膵癌の生物学的悪性度に関与する可能性も示唆された。

このように多症例の消化器癌を用いてゲノム解析で同定された微生物種とその分子異常、さらに環境因子との関連を検討することは、将来的に膵癌の新たな予防法や診断・治療法に繋がる可能性があり、消化器癌の新たな治療戦略を世界に先駆けて報告できるものと思われる。よって多種の消化器癌における microbiome 解析の更なる発展が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

- (1) Noshio K, Sukawa Y, Adachi Y, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, Kanno S, Yamamoto I, Ishigami K, Igarashi H, Maruyama R, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity

and molecular alterations in colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2016;22:557-66. 査読有

(2) Kanno S, Noshō K, Ishigami K, Yamamoto I, Koide H, Kurihara H, **Mitsuhashi K**, Shitani M, Motoya M, Sasaki S, Tanuma T, Maguchi H, Hasegawa T, Kimura Y, Takemasa I, Shinomura Y, Nakase H. MicroRNA-196b is an independent prognostic biomarker in patients with pancreatic cancer. Carcinogenesis. 2017;38:425-31. 査読有

(3) Yamamoto I, Noshō K, Kanno S, Igarashi H, Kurihara H, Ishigami K, Ishiguro K, **Mitsuhashi K**, Maruyama R, Koide H, Okuda H, Hasegawa T, Sukawa Y, Okita K, Takemasa I, Yamamoto H, Shinomura Y, Nakase H. EZH2 expression is a prognostic biomarker in patients with colorectal cancer treated with anti-EGFR therapeutics. Oncotarget. 2017;8:17810-8. 査読有

(4) 能正勝彦, 須河恭敬, **三橋慧**, 仲瀬裕志. 大腸癌のゲノム・エピゲノム異常に基づいた発癌経路の解明とライフスタイル・腸内微生物との関連. 日本消化器病学会雑誌 2016年 113巻 第11号 1878-86. 査読無

(5) 能正勝彦, **三橋慧**, 仲瀬裕志. 大腸発癌と腸内細菌 Serrated pathway とのかかわり. 医学のあゆみ 2018年 264巻 第1号 71-5. 査読無

〔学会発表〕(計 4件)

(1) **三橋慧**, 能正勝彦, 須河恭敬, 菅野伸一, 山本至, 石上敬介, 伊藤美樹, 栗原弘義, 山本博幸, 篠村恭久, 仲瀬裕志. 消化器癌における Fusobacterium 属の陽性率と臨床病理・分子生物学的因子との関連. 第27回日本消化器癌発生学会総会. 2016.9.15-16. 鹿児島

(2) 能正勝彦, 栗原弘義, 丸山玲緒, 菅野伸一, 山本至, 石上敬介, 石黒一也, **三橋慧**, 沖田憲司, 竹政伊知朗, 山本博幸, 篠村恭久, 仲瀬裕志. 大腸癌におけるポリコーム蛋白 EZH2 発現と分子異常・生命予後との関連と microRNA-31 の制御機構. 第27回日本消化器癌発生学会総会. 2016.9.15-16. 鹿児島

(3) Noshō K, Sukawa Y, Kanno S, Yamamoto I, Ishigami K, **Mitsuhashi K**, Ito M, Kurihara H, Yamamoto H, Shinomura Y, Nakase H. Association of Fusobacterium species in Japanese gastrointestinal cancers with tumor molecular abnormalities and prognosis. The 75th Annual meeting of the Japanese cancer association. 2016.10.6-8. Yokohama.

(4) 能正勝彦, 栗原弘義, 山本至, 菅野伸一, 石上敬介, 石黒一也, **三橋慧**, 伊藤美樹, 丸山玲緒, 沖田憲司, 竹政伊知朗, 篠村恭久, 仲瀬裕志. 大腸癌の次世代分子診断・治療のバイオマーカーとしてのポリコーム蛋白 EZH2 と microRNA-31 の可能性. 第71回日本大腸肛門病学会学術総会. 2016.11.18-19. 伊勢

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
三橋 慧 (Mitsuhashi Kei)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号: 70772127

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者

能正 勝彦 (Nosho Katsuhiko)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：10597339