

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19353

研究課題名(和文)大腸癌におけるFusobacterium nucleatumの影響の解明

研究課題名(英文)The role of Fusobacterium nucleatum in colorectal carcinoma

研究代表者

梅沢 翔太郎(UMEZAWA, Shotaro)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：90737678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：60例の大腸癌患者の唾液、癌部及び正常粘膜から検体を採取した。それぞれの部位におけるFusobacterium属の存在割合を種レベルで比較した。Fusobacteriumの相対存在率は癌部で8.9%、非癌部で3.3%と、癌部で有意に高かった($p < 0.05$)。検出されたFusobacterium属をさらに種レベルで比較するとFusobacterium nucleatumの検出率は唾液で96%、大腸癌で93%だった。

研究成果の概要(英文)：We collected sample of saliva, tissue of carcinoma and normal colon mucosa from 60 patients with colorectal carcinoma. We investigated proportion of Fusobacterium genus in the level of species. Proportion of Fusobacterium in colorectal carcinoma tissue and normal colon mucosa were 8.9% and 3.3% respectively. Proportion in carcinoma was significantly high compared with in normal mucosa ($p < 0.05$).

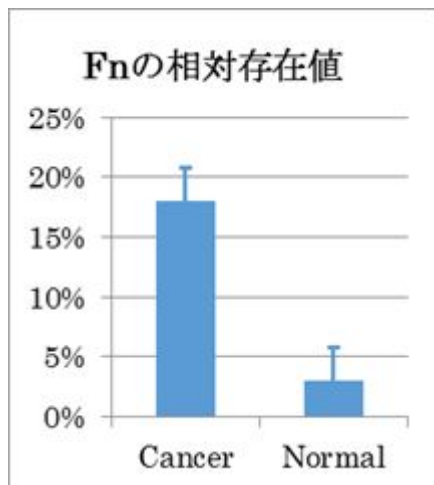
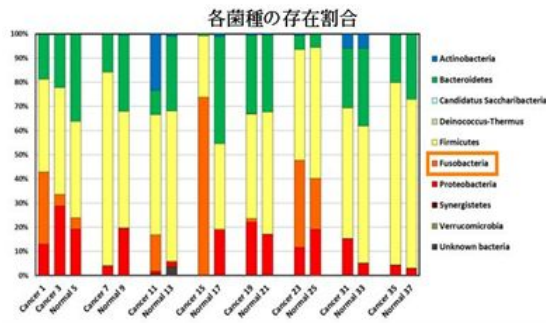
研究分野：大腸癌

キーワード：大腸発がん 腸内細菌 Fusobacterium nucleatum

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は全世界的に増加傾向であり、特に本邦においては2014年に予測罹患数が第1位で死亡数も長期的に持続して増加を示しており、早急な対策が求められる。大腸癌と同様にわが国で罹患率の高い胃癌は、*Helicobacter pylori* との関連が解明され、2014年には世界保健機関(WHO)で除菌による胃癌予防策を進めるとの方針が示された。一方、大腸癌の発症には腸内細菌の関与が示唆されているが未だ明らかとなっていない。近年 FISH、定量的 PCR 法、16S rRNA をターゲットにした解析などの発達によって多種に及ぶヒト腸内細菌が迅速かつ特異的に検出可能となり腸内細菌プロファイルが解明されてきた。この進歩に伴い、アレルギーや肥満、認知症などとの関連が明らかになりつつあり、大腸癌についても研究が始められている。

海外の研究により Fn が非大腸癌患者と比較し大腸癌患者の大腸から高頻度で検出されることが明らかとなった。我々は横浜市立大学附属病院の患者を対象に pilot study を実施し、日本人の大腸癌からも同様に高率に Fn を確認した(下図)。これまでの研究で Fn は大腸の炎症や大腸癌の遺伝子変異との関連が示唆されている。Fn は大腸癌において重要な役割を果たしていると考えられるが、Fn と大腸癌の関係を臨床に応用するに足る研究はなされていない。



2. 研究の目的

本研究は臨床研究と基礎実験から以下の3つの点を明らかにすることを目的とする。

Fn の由来

Fn は健常者の腸内に存在することは稀であり、大腸癌に感染する Fn がどこに由来するのかという点については解明されていない。Fn は人の口腔内常在菌としては頻度が高く、我々は大腸癌の Fn は口腔内に由来すると予想した。同一患者内において大腸癌から検出される Fn と口腔内の Fn に相同性が認められれば、大腸癌の Fn は口腔内に由来していることを明らかにできる。

Fn が大腸癌へ移行する感染経路

口腔内と大腸癌の細菌の解析で Fn の由来は明らかにすることができるが、口腔内から大腸にどのように移行するかについてはさらなる検討が必要である。移行経路として予想されるのは消化管を介した経路もしくは血流を介した経路の2つである。大腸癌モデルマウスを用いて感染経路を検討する。

Fn が大腸癌に及ぼす影響

Fn が大腸癌において果たす役割も解明すべき課題である。疫学研究では Fn 感染による大腸上皮の炎症と大腸癌との関連性の報告があり(引用文献2)、また Fn が感染している大腸癌では BRAF や MHL のメチル化、CIMP の高メチル化といった遺伝子変異が高い頻度で認められることが報告されている。しかしこれらが Fn 感染の原因と結果のいずれであるのかについては不明である。

3. 研究の方法

本研究はヒトを対象とした臨床研究と大腸発癌モデルマウスを用いた基礎実験からなる。臨床研究では、患者から採取した大腸癌組織および唾液中に含まれる細菌を解析し Fn の相同性を確認する。マウスを用いた基礎実験では、化学発癌物質の投与により大腸発癌モデルマウスを作成し、既に我々が単離培養を行った Fn の経口的および経静脈的な投与を行い感染経路を明らかにする。感染方法の証明後、長期感染モデルマウスを作成し腫瘍の数やサイズがどのように変化するかを調べる。また、Fn 感染が発癌メカニズムにどのような影響を与えるかについても免疫組織学的手法および生化学的手法で明らかにする。マウス腫瘍部の遺伝子解析により、Fn が腫瘍中の遺伝子変異を引き起こすかどうかについても検討する。横浜市立大学附属病院にて大腸癌の検査/治療目的に下部消化管内視鏡検査を実施する患者を対象として、大腸癌組織と口腔内の細菌を解析する。大腸癌組織は内視鏡検査時に生検によって安全に採取が可能である。既存の研究では、腸内細菌の解析を行う際に便を検体として採取することが多く大腸内の細菌という形で大まかな解析がされていた。本研究では次世代シーケンサーで大腸組織そのものを解析するという最新の方法を用いて癌部/非癌部などの細かい部位に分けた検討が可能となっている。口腔内の細菌は患者の唾液を用い

て解析ができることが既に確認できている。検体はまず 16s rRNA をターゲットにシークエンス解析を行う。16s RNA の解析では菌種の確認までしかできないため、Fn が大腸癌と唾液の両方から検出された症例については Fn の培養を実施し菌の全遺伝子の相同性を確認する。大腸癌中の Fn と唾液から検出された Fn の遺伝子の相同性が確認できれば、大腸癌に感染している Fn は口腔内に由来していること有力な根拠となる。

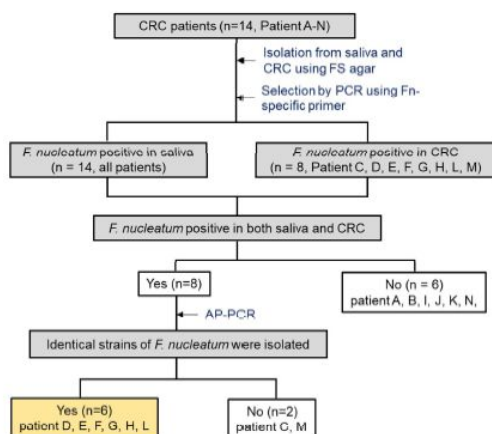
4. 研究成果

60 例の大腸癌患者の唾液、癌部及び正常粘膜から検体を採取した。次世代シーケンサーを用いて細菌の系統分類別に菌叢の解析を行った。次に、大腸癌と正常粘膜で相対存在率に差のある群を比較した。さらにそれぞれの部位における *Fusobacterium* 属の存在割合を種レベルで比較した。

Fusobacterium の相対存在率は癌部で 8.9%、非癌部で 3.3%と、癌部で有意に高かった ($p < 0.05$)。検出された *Fusobacterium* 属をさらに種レベルで比較すると Fn の検出率は唾液で 96%、大腸癌で 93%だった。

さらに 14 例の大腸癌患者を対象として唾液および癌部から検体を採取し、分離培養を行った。Fn に特異的なプライマーを用いて Fn の有無を評価した。また、Fn が大腸癌と唾液から共に検出された症例についてはさらに AP-PCR を行い、株レベルで共通するものがあるかを評価した(図 1)。また、唾液、大腸腺腫、大腸癌の検体について定量 PCR を行い、Fn の検出率を比較した。

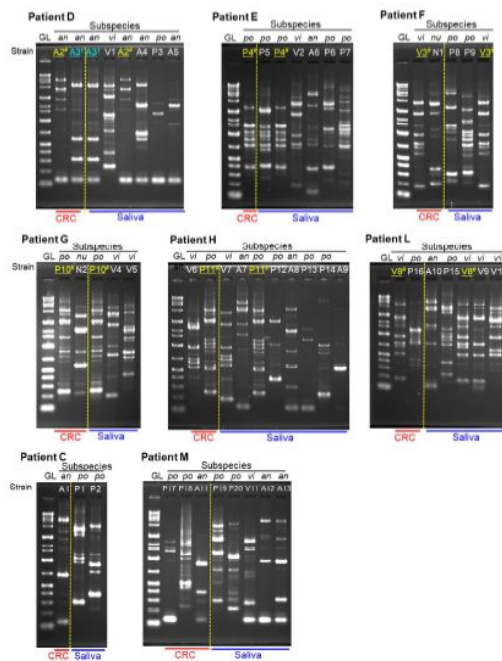
(図 1)



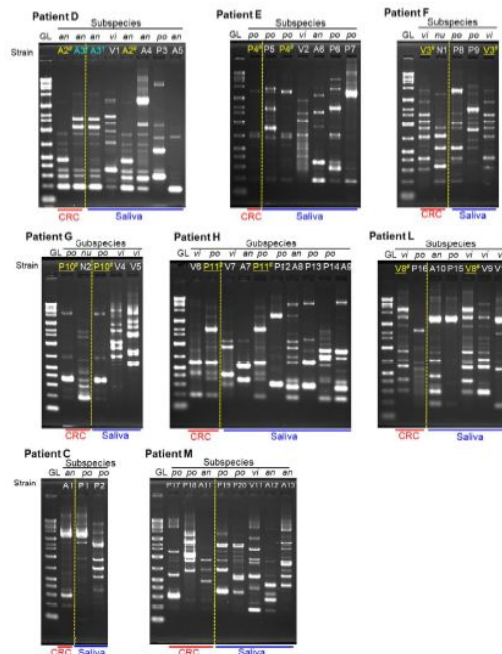
14 名のうち、大腸癌は 8 名で Fn を検出した。また、唾液は 14 名全員から検出した。大腸癌、唾液で共に Fn が検出された 8 例については AP-PCR により合計で 1351 株を認め、75% の症例で株の一致を認めた(唾液 図 2、大腸癌 図 3)。うち 1 例の結果例を図 4 に示す。また、定量 PCR では唾液で 92%、大腸正常粘膜で 4%、大腸腺腫で 12%、大腸癌で 34%に Fn を検出した。特に進行大腸癌に限れば 81%で

Fn を検出した。

(図 2)



(図 3)



(図 4)

Table S5. *Fusobacterium* isolation from patient D

GAG				Saliva			
Colony ID	Ph check	Subspecies identified by 16S sequence	AP-PCR pattern	Colony ID	Ph check	Subspecies identified by 16S sequence	AP-PCR pattern
15714-C1	+	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2	15714-S1	-	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A3
15714-C2	-			15714-S2	-		
15714-C3	-			15714-S3A	-	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2
15714-C4	-			15714-S3B	-	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i>	V1
15714-C5	-			15714-S4	-	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2
15714-C6	-			15714-S5	-		
15714-C7	-			15714-S6	-	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A3
15714-C8	-			15714-S7	-		
15714-C9	-			15714-S8	-	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2
15714-C10	-			15714-S9	-	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A3
15714-C11	-			15714-S10	-	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polyphorum</i>	P3
15714-C12	-			15714-S11	-	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2
15714-C13	-			15714-S12	-		
15714-C14	-			15714-S13	-	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i>	V1
15714-C15	-			15714-S14	-		
15714-C16	-			15714-S15	-		
15714-C17	-			15714-S16	-	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A3
15714-C18	-			15714-S17	-	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2
15714-C19	-			15714-S18	-	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i>	V1
15714-C20	+	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2	15714-S19	-	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2
15714-C21	-			15714-S20	-	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2
15714-C22	-			15714-S21	-		
15714-C23	+	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2	15714-S22	-		
15714-C24	-			15714-S23	-		
15714-C25	-			15714-S24	-		
15714-C26	+	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2	15714-S25	-		
15714-C27	+	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2	15714-S26	-		
15714-C28	+	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2	15714-S27	-		
15714-C29	-			15714-S28	-		
15714-C30	-			15714-S29	-		
15714-C31	-			15714-S30	-		
15714-C32	-			15714-S31	-		
15714-C33	-			15714-S32	-		
15714-C34	-			15714-S33	-		
15714-C35	-			15714-S34	-		
15714-C36	+	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2	15714-S35	-		
15714-C37A	+	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2	15714-S36	-		
15714-C37B	+	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A3	15714-S37	-		
15714-C38	-			15714-S38	-		
15714-C39	-			15714-S39	-		
15714-C40	+	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2	15714-S40	-		
15714-C41	+	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2	15714-S41	-		
15714-C42	-			15714-S42	-		
15714-C43	+	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2	15714-S43	-		
15714-C44	-			15714-S44	-		
15714-C45	+	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2	15714-S45	-		
15714-C46	-			15714-S46	-		
15714-C47	+	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	A2	15714-S47	-		
15714-C48	-			15714-S48	-		

大腸癌患者において、大腸癌と口腔内で同一の Fn 株を持つ症例があるため、口腔内の Fn が何らかの経路により大腸癌に及んでいる可能性が示唆された。
培養した Fn を用いて、大腸発がんモデルマウスへの投与により、Fn の移行経路や Fn の及ぼす影響について検討を予定していたが、大腸発がんモデルマウスに十分なポリープが作成できなかった。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

2017/4/20 第 103 回 日本消化器病学会
総会 ワークショップ 5

小宮靖彦、日暮琢磨、中島淳

Correlation of *Fusobacterium nucleatum* in oral cavity and colorectal cancer

2017/10/12 JDDW (Japan Digestive Disease Week)

小宮靖彦、日暮琢磨、中島淳

Correlation of *Fusobacterium nucleatum* in oral cavity and colorectal cancer

2017/11/1 UEG (United European Gastroenterology)

小宮靖彦、日暮琢磨、中島淳

Association of *Fusobacterium nucleatum* in oral cavity and colorectal carcinomas

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] なし

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] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅沢翔太郎 (UMEZAWA Shotaro)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号 : 90737678

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

小宮靖彦 (KOMIYA Yasuhiko)