

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15920

研究課題名(和文)腸内細菌叢の機能と呼応する上皮のシングルセル解析による肥満関連大腸発癌機序の解明

研究課題名(英文)Obesity and colorectal neoplasm: Interaction between the gut microbiota and obesity-associated somatic genomic signals from colorectal adenoma and carcinoma

研究代表者

佐々木 悠 (Sasaki, Yu)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：60466620

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)：肥満関連大腸がん患者の腸内細菌叢は非肥満者に比し多様性が変化しており、特に*E. faecalis*と呼ばれる腸内細菌の減少が特徴的であることが分かりました。この細菌と血液中のLDL濃度(悪玉コレステロール)が相関していることも分かりました。大腸腺腫(前がん病変)および大腸癌の組織を用いて、癌に関連する409個の遺伝子変化を解析しました。その結果、肥満者の大腸腺腫および大腸癌に特徴的な遺伝子変化を複数同定することができました。今後はこれらの機能解析も含めた更なる包括的な解析を行い、肥満に関連した大腸発がんの発生機序を解き明かすことで、本病態の征圧に向けた新しい標的の探索を続けたいと考えています。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦で増え続けている肥満に関連した大腸がんにおける腸内細菌や遺伝子変化の特徴を明らかにしました。本病態の特徴を捉えることで、新しい予防や治療標的が創出できると考えられます。その結果、肥満関連大腸がんが征圧され、大腸がんになる患者さんの減少や死亡率の減少につなげることが可能となります。またこれらの知見は、世界に蔓延し、増加し続けている生活習慣病全般に関わる解析への応用も期待されます。

研究成果の概要(英文)：Several epidemiological studies have indicated that individuals with obesity are at increased risk of colorectal cancer (CRC) and adenoma (CRA). The gut microbiota is affected by dietary patterns and obesity. Several studies have shown the mechanisms by which some bacteria might influence CRC development. Furthermore, accumulated DNA damage has been reported in individuals with obesity.

In this study, we demonstrated that several compositional alterations of the gut microbiota in patients with CRC and suggested that decreased *E. faecalis* is associated with the obesity-related CRC development. In addition, we found that the somatic alteration landscape differs between obese and non-obese in both CRA and CRC. The gut microbiota and these genomic alterations might be the targets to understand the mechanisms of obesity-associated colorectal carcinogenesis, and they might help to provide new preventive and therapeutic strategies.

研究分野：消化器内科

キーワード：大腸発がん 大腸癌 大腸腺腫 肥満 インスリン抵抗性 メタボリックシンドローム LDL *E. faecalis*

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦において大腸がん患者は増加の一途をたどっており、この増加の主な要因は、肥満、メタボリックシンドローム (MetS) にあるとされる。事実、世界人口の3分の1が肥満に該当するとの報告があり、本邦でも MetS の割合が50%、肥満は30%にも達するとの報告がある (厚生労働省「国民健康・栄養調査」)。エビデンスのある便潜血検査による大腸がん検診や世界最高峰の消化器内視鏡技術による大腸ポリープ (前がん病変) 切除が広く一般に実施される基盤があるにも関わらず、この網目をかいくぐった大腸がんの増加がある。こういった背景を考えると、この肥満関連大腸がんに対しては、現行システムでの対策は不十分と考えられ、そのメカニズムに立脚した新しい戦略を探索することが極めて重要な課題であると考えられる。

「肥満が大腸発がんを導く」という病態仮説の中核にはインスリン抵抗性、高インスリン血症があるとされ、これまでにインスリン抵抗性やアディポサイトカイン分泌異常、慢性の低炎症状態と肥満関連大腸がんおよび腺腫 (前がん病変) との解析を行ってきた。更に、インスリンの分泌制御に関わる消化管ホルモン、インクレチン (GIP および GLP-1) の分泌異常が、肥満関連大腸がんおよび腺腫患者に生じていることを初めて明らかにした (*Metabolism* 2011;60:1253-8, *Gastroenterology* 2015:S592)。近年、種々のインクレチン関連製剤が開発され糖尿病治療に画期的な効果をもたらし、インクレチンがインスリン分泌や糖代謝制御に大きな影響を及ぼすことが実臨床でも示されている。したがって、肥満関連大腸がんにおけるインクレチン分泌異常のメカニズムとその影響を解析することは非常に重要な課題と考えられる。しかし、その分泌異常がなぜ生じ、どのように肥満関連大腸がんに関わるのかは全く分かっていない。

腸内細菌がエネルギーのホメオスタシスに深く関与し、肥満やインスリン抵抗性を引き起こすことが報告されている。この腸内細菌によって産生される短鎖脂肪酸は宿主のエネルギー源のみならず、脂肪酸受容体を介してエネルギーの恒常性維持に関与することが知られている。興味深いことに、腸管のインクレチン分泌細胞である L 細胞には、この脂肪酸受容体の発現があるとされる。一方、ヒト大腸がんと腸内細菌叢の変化の関連性も報告されている。これらのことから腸内細菌叢がインクレチン分泌異常を背景にもつ肥満関連大腸がんの発生に関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

肥満関連大腸がんにおける腸内細菌叢の機能解析を行い、それと関連する宿主のインクレチン分泌や代謝異常および大腸上皮での遺伝子発現の変化を明らかにすること。

3. 研究の方法

糞便から微生物由来の DNA を抽出し、(1) 次世代シーケンサーにより菌叢解析を行い、肥満関連大腸がんに関与する腸内細菌叢を検討し、(2) 大腸上皮、癌のシングルセルレベルでの網羅的なトランスクリプトーム解析を行う。更に、(3) 腸内細菌叢と遺伝子発現変化、代謝の解析を統合して、肥満関連大腸がん発生のメカニズムを検討する。

4. 研究成果

(1) 肥満関連大腸がんに関連した腸内細菌叢

個々の腸内細菌叢データから主成分分析を行い、また Shannon index と Chao1 index を算出したところ、健常者と大腸癌群では腸内細菌の多様性に変化があることが分かった。門レベルで比較すると、大腸癌群で Actinobacteria ($p < 0.05$)、Fusobacteria ($p < 0.01$)、Tenericutes

($p < 0.01$) の 3 つの門の割合が有意に高かった (図 1)。属レベルで比較すると、38 の属の割合が大腸癌群で有意に高く ($p < 0.05$)、9 の属の割合が大腸癌群で有意に低かった ($p < 0.05$)。

健常者と大腸癌で割合に差のみられた 47 属のうち、非肥満(nOb)大腸癌患者に比べ、肥満(Ob)関連大腸癌では *Enterococcus* の割合が有意に低く ($p < 0.01$)、*Polaribacter* ($p < 0.01$) と *Capnocytophaga* ($p < 0.01$) の割合が有意に高かった (図 2)。

Enterococcus を種レベルで解析すると、大腸癌の nOb では *E. faecalis* の割合が最も高かったが、Ob では低

かった (図 3a)。腸内細菌叢全体に占める *E. faecalis* の割合は、大腸癌群では nOb に比し Ob で有意に低かった ($p < 0.01$ 、図 3b) が、対照群では nOb と Ob に差はなかった。

現在、大腸腺腫例における解析、菌叢機能の同定、*E. faecalis* が大腸癌の発育進展に与える影響を解析中である。

図 1

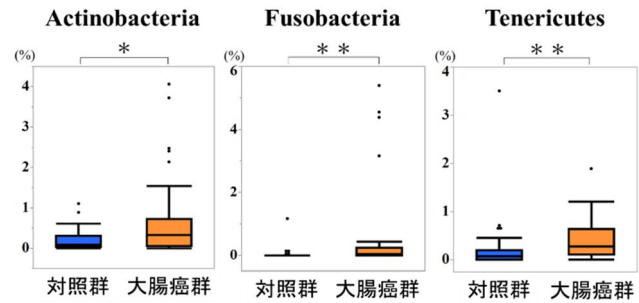


図 2

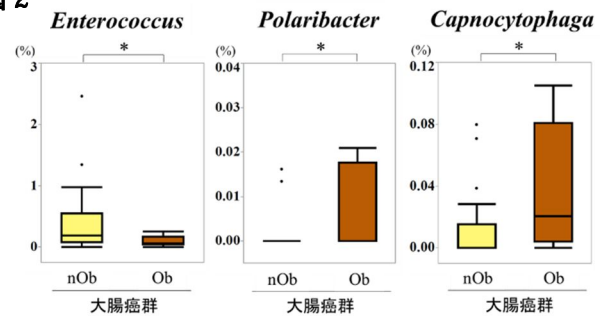
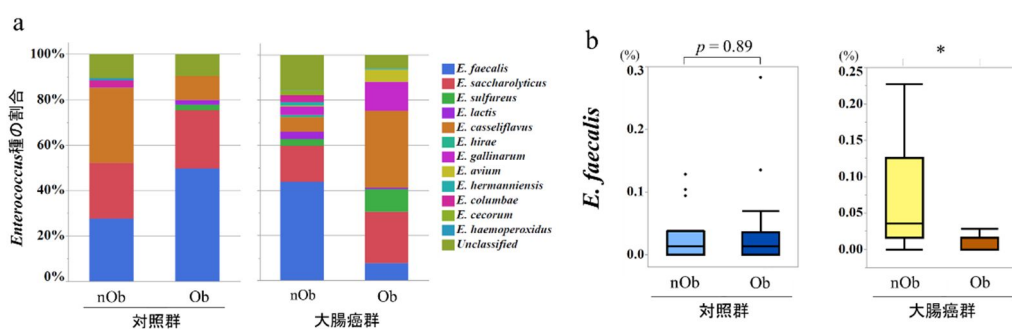


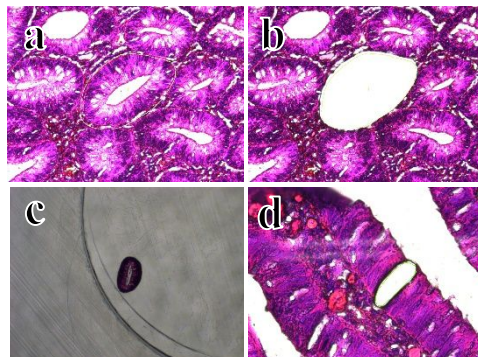
図 3



(2) 大腸上皮のシングルセル解析

パラフィン包埋組織 (FFPE) を用いたシングルセル解析を行った。Lica LMD6 を用い一腺管 (図 4a)、一細胞 (図 4b) を切り出す方法を最適化した。

図 4

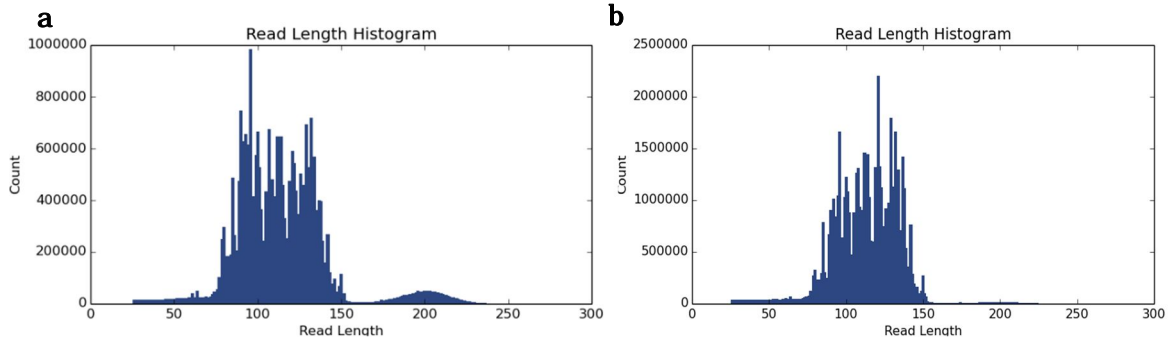


HE 染色標本を用い一腺管 (a) ないし一細胞 (d) を同定し、切り出した (b, d: 切り出した後, c: 切り出した一腺管)。

切り出した組織を用いて、DNA 抽出し、whole genome amplification (WGA) を行い、シーケンズライブラリを作成したが、網羅的な解析を行うための十分なカウント数が得られなかった (図 5a)。WGA 後に更に reamplification したが、十分量のライブラリを作成できなかった

(図 5b)。

図 5

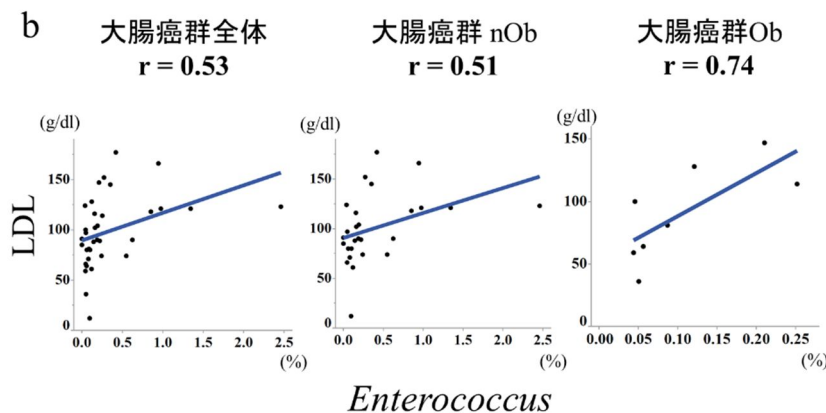


同様に RNA を抽出し、RamDA-seqTM 法で cDNA を合成したが、極めて微量しか得られなかった。FFPE を用い、インクレチン分泌細胞や幹細胞のシングルセルレベルの解析を考えていたが、現時点では技術的困難が高いものと考えられた。そこで、肥満関連大腸腺腫および癌の組織を用い癌関連 409 遺伝子の網羅的なバリエーション解析を行い、非肥満者と比較検討を行った。肥満関連大腸腺腫では有意に *APC*、*FGFR1*、*POU5F1*、*PTCH1*、*SMUG1*、*TSHR1*、*XPC* のバリエーション頻度が高かった。肥満関連大腸腺腫の 60% 以上で *CDKN2A*、*FEFR3*、*JAK1*、*MYH9*、*PER1*、*PLEKHG5*、*RALGDS*、*TSHR* および *XRCC2* に 9 つ hot spot を認め、これらは nOb では認められなかった。非肥満の大腸癌では有意に *BAP1*、*CMPK1*、*CSF1R*、*FGFR3*、*FH*、*FLT4*、*MAP2K1*、*NOTCH1* および *PTCH1* のバリエーション頻度が高かった。肥満関連大腸癌では有意にバリエーション頻度が高い遺伝子は認められなかったが、60% 以上で *ROS1*、*GNAS*、*AFF* および *DST* に 6 つの hot spot を認め、これらは nOb では認めなかった。現在は、機能解析も含めた更なる検討を行っている。

(3) 腸内細菌叢と代謝の関連性

シングルセルレベルでの遺伝子発現解析が困難であったため、代謝因子との関連性についてのみ検討した。nOb と Ob の大腸癌で差の見られた *Enterococcus*、*Campylobacter* の割合と空腹時血糖、HbA1c、インスリン、HOMA-1R、中性脂肪、総コレステロール、HDL、LDL との関連性を検討した。*Enterococcus* が血中の LDL 濃度と有意な相関があり、特に肥満関連大腸癌で強かった ($r = 0.74$ 、図 6)。

図 6



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sasaki Yu, Abe Yasuhiko, Takeda Hiroaki, Nishise Shoichi, Yaoita Takao, Yagi Makoto, Sakuta Kazuhiro, Mizumoto Naoko, Shoji Masakuni, Onozato Yusuke, Kawata Sumio, Ueno Yoshiyuki	4. 巻 97
2. 論文標題 Impaired Secretion of Glucagon-Like Peptide 1 in Patients with Colorectal Adenoma after an Oral Glucose Load	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 324 ~ 332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1159/000486129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yagi Makoto, Sasaki Yu, Abe Yasuhiko, Yaoita Takao, Sakuta Kazuhiro, Mizumoto Naoko, Shoji Masakuni, Onozato Yusuke, Kon Takashi, Nishise Shoichi, Ueno Yoshiyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Association between High Levels of Circulating Chemerin and Colorectal Adenoma in Men	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000501477	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐々木悠、阿部靖彦、上野義之
2. 発表標題 肥満、メタボリックシンドロームを共通の危険因子とする大腸腺腫とNAFLD併存例の解析
3. 学会等名 第60回日本消化器病学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木悠、阿部靖彦、上野義之
2. 発表標題 肥満、メタボリックシンドロームからの大腸腫瘍へのインクレチンの関与
3. 学会等名 第103回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々木悠、阿部靖彦、矢尾板孝夫、八木周、上野義之
2. 発表標題 インクレチン分泌異常：肥満、メタボリックシンドロームからの大腸腫瘍に関連する新しい病態
3. 学会等名 第204回日本消化器病学会東北支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木悠、武田弘明、阿部靖彦、西瀬祥一、河田純男、上野義之
2. 発表標題 インクレチンの分泌異常と大腸腺腫との関連性
3. 学会等名 第14回日本消化管学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yu Sasaki, Hidenori Sato, Yasuhiko Abe, Kazuhiro Sakuta, Takao Yaoita, Makoto Yagi, Naoko Mizumoto, Masakuni Shoji, Yusuke Onozato, Shoichi Nishise, Yoshiyuki Ueno
2. 発表標題 Tumor mutational burden as a novel risk factor for metachronous recurrence of early gastric cancer after curative endoscopic submucosal dissection
3. 学会等名 American Gastroenterological Association, DDW2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 "H. pylori除菌者の胸やけ、肥満、メタボリックシンドローム～山形県コホート研究～
2. 発表標題 佐々木悠、阿部靖彦、矢尾板孝夫、八木周、作田和裕、水本尚子、東海林正邦、小野里祐介、西瀬祥一、嘉山孝正、上野義之
3. 学会等名 第24回日本ヘリコバクター学会学術集会、シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤秀則、宮野佑樹、村上綾子、佐々木悠、江見充
2. 発表標題 アンブリコンシーケンスによるcfDNAからのモザイク変異判定に向けたパイプラインの検討
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第63回大会、一般演題
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木悠、阿部靖彦、上野義之
2. 発表標題 肥満、メタボリックシンドロームを共通の危険因子とする大腸腺腫とNAFLD併存例の解析
3. 学会等名 第60回日本消化器病学会大会（JDDW2018 第26回日本消化器関連学会週間）、パネルディスカッション
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木悠、阿部靖彦、矢尾板孝夫、八木周、水本尚子、東海林正邦、小野里祐介、今孝志、上野義之
2. 発表標題 肥満をリスク因子とする大腸腺腫とNAFLD合併例の検討
3. 学会等名 第9回肥満と消化器疾患研究会、一般演題
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木悠、阿部靖彦、上野義之
2. 発表標題 Helicobacter pylori除菌後の体重変化～山形県コホートによる前向き検討～
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会、シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東海林正邦、佐々木悠、上野義之
2. 発表標題 進行大腸がん患者における腸内細菌叢の解析
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会、ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野里祐介、佐々木悠、阿部靖彦、矢尾板孝夫、八木周、水本尚子、東海林正邦、今孝志、上野義之
2. 発表標題 Cell-free DNAと大腸癌組織のgene variantsの比較
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会、一般演題
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yu Sasaki, Yasuhiko Abe, Takao Yaoita, Makoto Yagi, Naoko Mizumoto, Masakuni Shoji, Yusuke Onozato, Takashi Kon, Shoichi Nishise, Yoshiyuki Ueno
2. 発表標題 Association between colorectal adenoma and nonalcoholic fatty liver disease: sharing common risk factors with obesity and metabolic syndrome
3. 学会等名 American Gastroenterological Association, DDW2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木悠、阿部靖彦、上野義之
2. 発表標題 大腸腺腫における肥満、メタボリックシンドローム～非アルコール性脂肪肝および脂肪膵の合併例の検討～
3. 学会等名 第98回日本消化器内視鏡学会総会 (JDDW2019 第26回日本消化器関連学会週間)、ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東海林正邦、佐々木悠、阿部靖彦、矢尾板孝夫、八木周、水本尚子、小野里祐介、今孝志、上野義之
2. 発表標題 大腸癌患者における体重維持と腸内細菌叢の関連
3. 学会等名 第61回日本消化器病学会大会 (JDDW2019 第26回日本消化器関連学会週間)、一般演題
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東海林正邦、佐々木悠、上野義之
2. 発表標題 大腸癌患者における腸内細菌叢と肥満・代謝異常との関連性
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会、パネルディスカッション
4. 発表年 2020年

〔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