

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06046

研究課題名(和文) 微生物学的統御の違いにおける腸内細菌叢と大腸がんの関連性の解明

研究課題名(英文) Clarification of the relation between gut microbiota and intestinal neoplasia with the difference in microbial control

研究代表者

小久保 年章 (Kokubo, Toshiaki)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門・上席研究員

研究者番号：10425663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がんに関して、腸内細菌叢の違いが消化管腫瘍の発生数を変化させることの十分な解明はされていない。本研究では、Apc MinマウスがSPF又はコンベンショナルな環境で発生する消化管腫瘍が、腸内細菌叢とどのような関係になっているかを検討した。その結果、我々の実験動物施設では、マウスの腸内細菌叢はProteobacteria門とBacteroidetes門の細菌がほとんどを占め、それらの比率が飼育環境で異なることが明らかとなり、Apc Minマウスでは、飼育環境の違いにより小腸の腫瘍増加する部位が異なる判明した。また消化管腫瘍の悪性化に関与する可能性のある菌種があることも分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんは罹患者数が多いこともあり様々な研究が進められ、その原因の一つに腸内細菌叢が関与していることが報告されているが十分に解明されていない。本研究は、大腸がんモデル動物のマウスを用いて検討したところ、飼育する環境の違い、即ち腸内細菌叢の違いで消化管腫瘍が増加する部位が異なる傾向が明らかとなった。また消化管腫瘍の悪性化(がん化)に関与する可能性のある菌種を見出したことは、重要な情報と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Colorectal cancer has not been fully understood how differences in gut microbiota affect the incidence of tumors in the digestive tract. In this study, we investigated how digestive tract tumors that develop in Apc Min mice housed in SPF or conventional environments are related to gut microbiota. The results showed that in our experimental animal facility, the gut microbiota of mice consisted mostly of Proteobacteria and Bacteroidetes, and that the ratio of these bacteria differed depending on the rearing environment, and that in Apc Min mice, tumor growth sites in the small intestine differed depending on the rearing environment. We also found that some species of bacteria may be involved in the malignant transformation of tumors of the digestive tract.

研究分野：実験動物、実験病理

キーワード：腸内細菌叢 Apc Minマウス 大腸がん メタゲノム解析 SPF動物 コンベンショナル動物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 大腸がんは、日本において男女合計の罹患者数が常に上位にあり、重点的に対策を取組むべき疾患の一つである。大腸がん発生のリスク因子として、加齢、肥満、飲酒、運動不足、ストレス、腸内細菌叢の関与など数多く認められている。大腸がんのメカニズム解析の一つとしてモデル動物が用いられ、多くは SPF (specific pathogen free) 動物として実験が進められている。一方、このモデル動物の微生物学的統御を変えて実験すると異なる結果が報告されている。大腸がんモデル動物の Apc Min マウスの実験では、無菌、SPF、コンベンショナル(CV)の順に(微生物が多いほど)消化管腫瘍数の増加が確認されている。このように微生物学的統御の違い、即ち腸内細菌叢の違いが消化管腫瘍の発生数を変化させる理由について十分に解明されていない。

(2) 放射線はその線種、線量にもよるが、腸内細菌に影響を及ぼすことが明らかで、消化管への放射線照射により、構成する腸内細菌の種類や細菌数を減少させて腸内細菌叢の多様性が低下する dysbiosis (ディスバイオシス) 状態となり、疾病の誘発を招くと考えられている。大腸がん治療の際に抗がん剤と併用される放射線治療は有効とされているが、副作用の dysbiosis への対策が必要となっている。

### 2. 研究の目的

大腸がんのモデル動物は、微生物学的統御の違い、別な視点から見ると腸内細菌叢の相違により、発生する腫瘍数が変化することが明らかである。しかし、腸内細菌叢の違いが消化管腫瘍の発生数を変化させる理由について、十分に解明されていない。そこで本研究では、大腸がんの対策の基礎研究として、Apc Min マウスにおいて、SPF ないしコンベンショナルな環境で発生する消化管腫瘍が、腸内細菌叢とどのような関係になっているかを明らかにする。また放射線照射により変化した腸内細菌叢は、消化管腫瘍にどのように影響を及ぼしているかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 先行の動物実験での解析

SPF 環境又は CV 環境下で、C3B6F1 系統を背景の Apc Min マウスに 2 週齢時に X 線又は  $\gamma$  線を 2Gy 照射し、その後 30 週齢時に盲腸内容物を凍結保管していた。これらの試料より DNA 抽出して 16S rRNA のメタゲノム解析を行った。また Apc Min マウスの小腸に認められた腫瘍の部位別特徴の解析を行った。

#### (2) SPF と CV 環境飼育下での Apc Min マウスの糞便中の細菌解析

SPF 環境又は CV 環境で飼育している Apc Min マウスについて、それぞれ 5 週齢と 18 週齢のマウスから糞便を採取し、DNA 抽出後に 16S rRNA のメタゲノム解析を行った。

#### (3) 動物実験

SPF 環境で作出した C3B6F1 系統を背景の Apc Min マウスを用いて、2 週齢時に X 線 2Gy 照射した。また(2)の実験で特定した 4 菌株と大腸がんとの関連が報告されている *Fusobacterium nucleatum* を加えた 5 菌株を用いて、1 菌種ずつ投与する群を設定して 5-6 週齢時、12 週齢時、15-16 週齢時、20 週齢時及び 25 週齢時に経口投与した。30 週齢での消化管腫瘍の変化、糞便中の細菌のメタゲノム解析、糞便中の有機酸と pH 測定を行った。飼育は CV 施設内のバイオクリーンカプセル装置にて、アイソレータほどの微生物統御まで出来なかったが可能な限りの微生物統御を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 先行動物実験の試料を用いた解析

盲腸内容物から抽出した DNA を用いて、次世代シーケンサーにてシーケンス解析して、得られた配列データを多様性指数解析(Chao 1 指数と Shannon 指数の解析)、主成分解析(UniFrac 解析)を行った。SPF 環境と CV 環境の菌叢の均一性で有意差を認め(図 1)、SPF 環境、CV 環境、放射線照射の有無を加えたグループ間でも有意差を確認した。また放射線照射の有無に関係なく SPF 環境下のマウスは、CV 環境のマウスに比べて *Bacteroidetes* の比率が高いこと、*Actinobacteria* と *Proteobacteria* の比率が低いことが分った(図 2)。

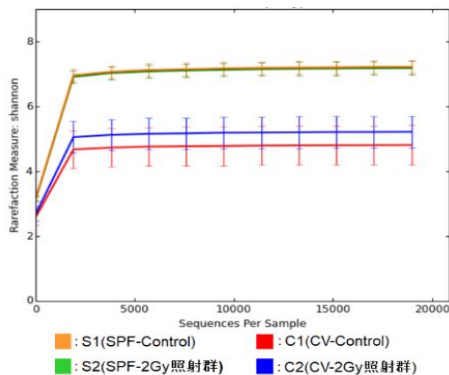


図1. α多様性指数解析-Shannon指数 -

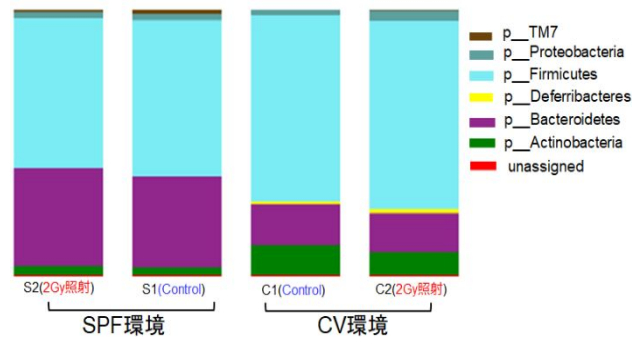


図2. 細菌の分類解析 -門レベル-

全小腸を3分割した組織標本の消化管腫瘍を部位別に解析すると、放射線照射したApc MinマウスではSPF環境では小腸遠位部、CV環境では小腸近位部でそれぞれ腫瘍増加が認められ、飼育環境下での違いがみられた。

### (2) 糞便中の細菌解析

先行の動物実験で解析した結果から特定の菌種を絞るまで至らなかったため、SPFないしCV飼育環境下のApc Minマウスについて、5週齢と18週齢のマウスから糞便を採取し、DNA抽出後に16SrRNAのメタゲノム解析を行った。その結果92種類の細菌を特定した。このうちSPF、CV飼育環境のいずれも高い割合を示した2菌種(*Bacteroides*属菌、*Enterococcus*属菌)、SPF飼育環境で高い割合を示した1菌種(*Clostridium*属菌)、さらにCV飼育環境で高い割合を示した1菌種(*Akkermansia*属菌)を選定して、無菌のApc Minマウスと無菌の野生型マウスに投与する候補細菌とした。これら4菌種は、メタゲノム解析から得られたものであり、糞便中より分離していないため、4菌株とも理研BRCから標準細菌を入手し、マウスへの投与検体の調製を行った。

(3) 予定していたピニールアイソレータを用いた実験・飼育については、微生物のコンタミ、飼育の維持に必要な高圧蒸気滅菌器の蒸気配管不備、新型コロナウイルス感染症対応のため、アイソレータでの作業が出来ない状態が研究期間の大半を占めたため、無菌のApc Minマウスを作出し、(2)で選定した菌種を投与したApc Minマウスへの放射線照射、アイソレータ内での飼育、定期的に糞便を採取して細菌叢解析まで至らなかった。アイソレータほどの微生物学的統御ではないが、バイオクリーンカプセル装置を用いて選定した菌種を用いた実験を行った。

### (4) 選定した菌種を用いた動物実験

(2)の解析で特定した4菌種と*Fusobacterium nucleatum*をX線照射後のApc Minマウスに経口投与した。30週齢時の糞便中の細菌叢は細菌投与しない群と比べて、いずれも差異はみられなかった(図3)。糞便中の短鎖脂肪酸は菌投与しないマウスと同様な値(ギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸の合計値:5.2~7.8mg/g)を示し、pHは菌投与しないマウスで8.58に対し菌投与したマウスで6.28~7.88の範囲にあった。大腸がん患者の便は、健康者に比べて短鎖脂肪酸の減少やpHの上昇がみられる報告があるが、今回の実験では、これらの変化は認められなかった。

小腸腫瘍数はいずれの菌種においても菌投与しないApc Minマウスと同程度であったが、がんとなる比率は投与したいずれの菌種においても高値であった(図4)。

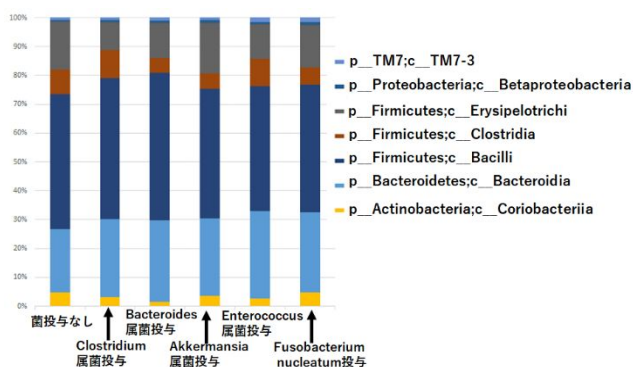


図3. 細菌の分類解析 -網レベル-

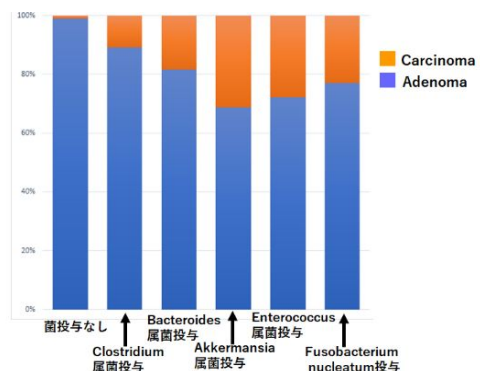


図4. 小腸腫瘍の悪性/良性の割合

( 5 ) 我々の実験動物施設の SPF 環境と CV 環境でのマウスの腸内細菌叢は *Proteobacteria* 門と *Bacteroidetes* 門の細菌がほとんどを占め、それらの比率が飼育環境で異なることが分かった。また大腸がんモデル動物の Apc Min マウスにおいて、SPF 環境と CV 環境の違いにより腫瘍増加する部位が異なる傾向が明らかとなった。ノトバート化した Apc Min マウスした状態での実験には至らなかったが、消化管腫瘍の悪性化に関与する可能性のある菌種があることを見出したことは、重要な情報と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小久保年章, 石田有香, 相澤竜太郎, 森岡孝満, 柿沼志津子
2. 発表標題 Minマウスを用いた腸内細菌叢と大腸がんの関連性に関する検討
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究分担者	石田 有香  (Ishida Yuka)  (40415435)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門・主幹研究員    (82502)	
研究分担者	相澤 竜太郎  (Aizawa Ryutaro)  (70814680)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門・研究員    (82502)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------