

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15776

研究課題名(和文)食道アカラシアにおける食道細菌叢同定とCAGE法を用いた食道発癌リスク解析

研究課題名(英文) Evaluation of esophageal microbiota and the risk of esophageal squamous cell carcinoma in patients with achalasia

研究代表者

高橋 一也 (Takahashi, Kazuya)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：90793068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：経口内視鏡的筋層切開術(POEM)後には食道内でHaemophilusとNeisseriaの割合が有意に増加し、POEMの合併症である逆流性食道炎の関与が疑われた。しかしながら、POEM前後で食道内細菌叢の多様性に有意な変化はみられなかった。また食道内細菌叢と食道炎・食道扁平上皮癌発癌の関連は見いだせなかった。

内視鏡的な炎症所見はPOEM後に有意に改善しており、食道細菌叢の異常以外の機序(例えば機械的な刺激など)が慢性的な食道炎と関与している可能性が示唆された。POEMによる炎症所見の改善は将来的な発癌予防につながる可能性があり、POEMは発癌予防の観点からも有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道アカラシア患者における口腔内・食道内細菌叢はアカラシアの治療である経口内視鏡的筋層切開術(POEM)の前後で大きな変化はみられず、食道炎や食道癌発症との関連は不明であった。しかしながら、食道アカラシア患者の内視鏡的な炎症所見は、POEM後に改善がみられた。食道アカラシアの慢性的な食道炎は、食道細菌叢の異常以外の機序(例えば機械的な刺激など)で生じている可能性が示唆された。POEMによる炎症所見の改善は将来的な発癌予防につながる可能性があり、POEMは発癌予防の観点からも有効である可能性が示唆された。今後症例数を増やしてさらなる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The compositions of microbiota were significantly different between the buccal mucosa and the esophageal mucosa in patients with achalasia. Haemophilus and Neisseria in the esophagus significantly increased after POEM, which might have been associated with acid reflux after per-oral endoscopic myotomy (POEM). Furthermore, inflammation of the esophageal mucosa endoscopically improved after POEM, implying that POEM might reduce the risk of esophageal squamous cell carcinoma. However, the overall structure of the oral and esophageal microbiota did not change before or after POEM, and disease-specific characteristics of the oral and esophageal microbiota in patients with achalasia and ESCC could not be detected. Further large-scale studies with healthy controls are warranted to determine definitive conclusions.

研究分野：消化器

キーワード：食道アカラシア 食道内細菌叢 経口内視鏡的筋層切開術 食道癌

## 1. 研究開始当初の背景

食道アカラシアは下部食道括約筋の弛緩不全により、食道胃接合部の通過障害を来し、つかえ感、胸痛、逆流を来す食道運動異常である。食道扁平上皮癌は内視鏡治療、手術、放射線化学療法といった治療の進歩にも関わらず、予後不良な疾患であり、食道アカラシア患者における食道扁平上皮癌の発生率は年率 0.34%、一般人口と比較して 7-50 倍のリスクを有することが報告されている。食道扁平上皮癌のリスク因子としてアルコールや喫煙が報告されており、これら因子が様々な分子異常を引き起こし、発癌に至る経路が報告されている。しかしながら、食道アカラシア患者における飲酒・喫煙の頻度は必ずしも高いわけではなく、食道アカラシアにおける発癌は飲酒や喫煙とは異なった発癌機序による可能性がある。

食道アカラシア患者の食道上皮には炎症細胞浸潤が高頻度にみられることから、そのような慢性炎症が発癌につながるものと考えられる。食道アカラシアにおいては長時間に渡る食残渣貯留・口腔細菌貯留がしばしば生じるため、そのような環境下で食道内での細菌叢異常 (dysbiosis) が起こっていると推測される。これまでに食道アカラシア患者における口腔内・食道内細菌叢の報告はないが、我々は食道アカラシア患者の食道内で dysbiosis が生じ、それが食道慢性炎症、延いては食道扁平上皮癌の原因となるものと推測した。食道アカラシア患者と食道扁平上皮癌患者の口腔内・食道内細菌叢を比較することで、食道扁平上皮癌に関連した細菌叢の特徴が見つかる可能性があると考えた。

また日常臨床において、食道アカラシアに対する経口内視鏡的筋層切開術 (POEM) 後に内視鏡的に食道の炎症が改善することをしばしば経験することから、POEM 後に食道内細菌叢に改善がみられるの可能性がある。これまでに POEM が口腔内・食道内細菌叢に与える影響についての報告はない。

## 2. 研究の目的

- (1) 食道アカラシア患者における口腔内・食道内細菌叢を食道癌患者と比較すること
- (2) 食道アカラシア患者の口腔内・食道内細菌叢を POEM 前後で比較すること
- (3) POEM 前後の食道上皮の炎症所見を内視鏡的・組織学的に比較すること

## 3. 研究の方法

2018 年 8 月から 2019 年 2 月の間に当院で POEM を施行された食道アカラシア患者 6 名を対象とした。

POEM 施行 1 か月前の上部消化管内視鏡検査時に、口腔サンプルをスワブで採取、食道サンプルを経内視鏡的なブラッシングで採取し、16S rRNA メタゲノム解析により口腔内・食道内の細菌叢を解析した (Figure 1)。また食道の内視鏡的な炎症所見を評価するとともに、食道から生検検体を採取し、組織学的に炎症の程度を評価した。内視鏡的な炎症の評価には Figure 2 に示す Grading scale を用いた。

POEM 2 か月後にも同様の方法での検体採取と内視鏡評価を行い、POEM 前後で結果を比較した。

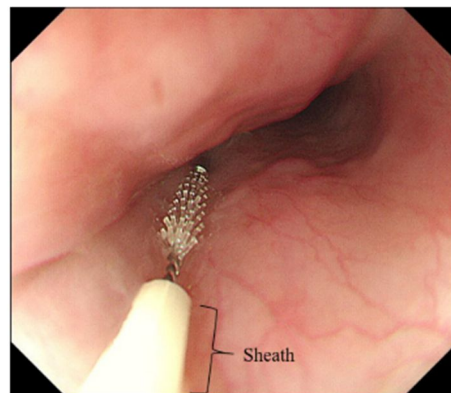


Figure 1. Collection of esophageal samples using a brush with a sheath. The surface of the mid-esophagus was gently brushed.

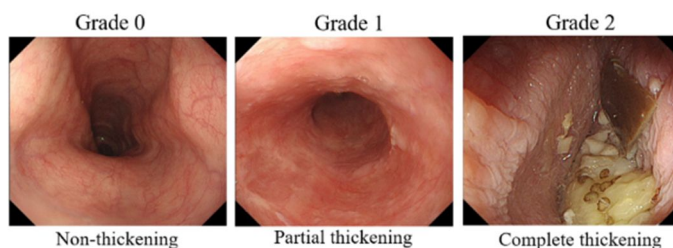


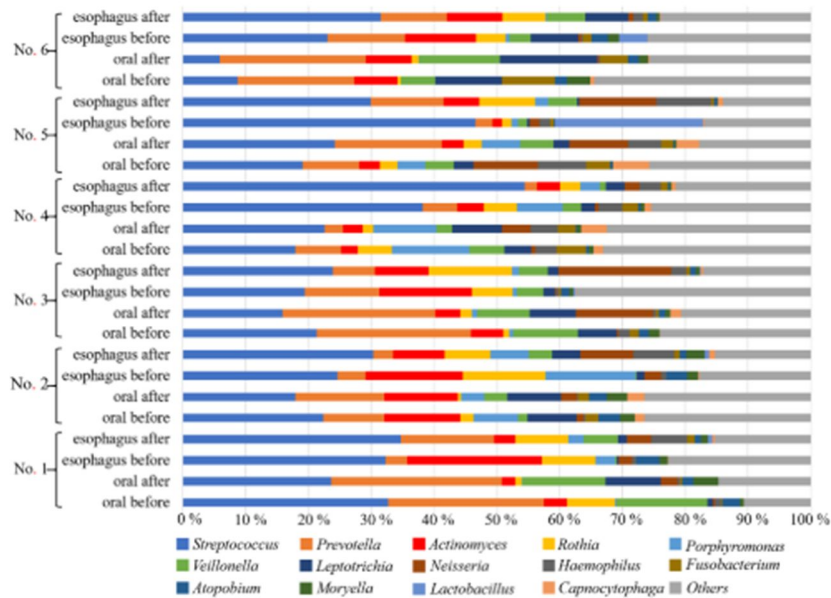
Figure 2. Grading of endoscopic findings. Endoscopic findings were graded as follows: grade 0, non-thickening; grade 1, partial thickening (intermediate between grade 0 and 2); and grade 2, complete thickening (disappearance of visibility of esophageal microvascular patterns and/or a white, cloudy surface on the mucosa).

また、当院で内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) を施行された表在型食道癌患者 14 名についても口腔検体・食道検体を採取し、細菌叢を解析して食道アカラシア患者と比較した。

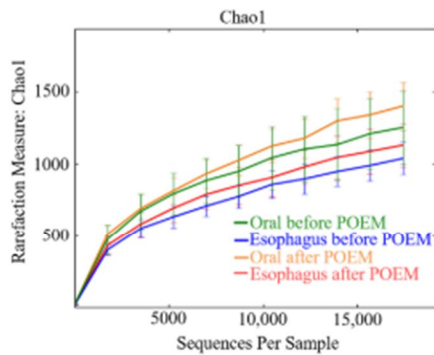
## 4. 研究成果

### 食道アカラシア患者の口腔内・食道内細菌叢

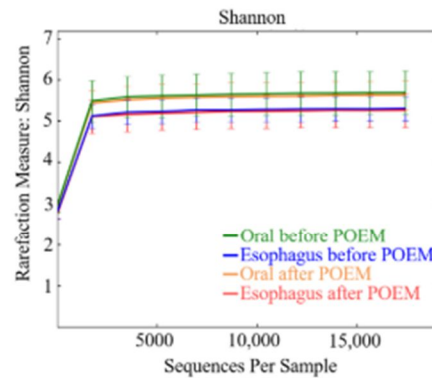
*Streptococcus* 属が食道アカラシア患者の口腔内 (18.3%)、食道内 (31.7%) で最も豊富な属種であった (Figure 3)。口腔内と食道内細菌叢で Chao1 index と Shannon index に有意な差は見られなかった。一方で、Principal coordinate analysis (PCoA) で口腔内と食道内細菌叢に有意差がみられたことから、口腔内・食道内の細菌叢の構成に有意な違いがあることが分かった (Figure 4, 5, 6)。



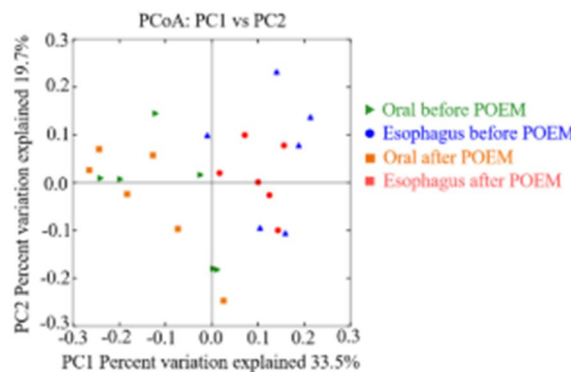
**Figure 3.** Relative abundance of oral and esophageal microbiota (genus level) in patients with achalasia before and after POEM. *Streptococcus*, *Prevotella*, *Actinomyces*, *Rothia*, and *Veillonella* were the most common genera. POEM, peroral endoscopic myotomy.



**Figure 4.** Chao1 index of the oral and esophageal microbiota of six patients with achalasia before and after POEM. There were no statistically significant differences. POEM, peroral endoscopic myotomy.



**Figure 5.** Shannon index of the oral and esophageal microbiota of six patients with achalasia before and after POEM. There were no statistically significant differences. POEM, peroral endoscopic myotomy.



**Figure 6.** Principal coordinate analysis of the oral and esophageal microbiota of six patients with achalasia before and after POEM. It showed significant differences between the oral and esophageal microbiota both before and after POEM. POEM, peroral endoscopic myotomy.

### 食道アカラシア患者と食道癌患者との比較

食道扁平上皮癌患者の口腔内（19.5%）・食道内（35.0%）においても *Streptococcus* が最も頻度の高い属種であった。食道アカラシア患者と食道扁平上皮癌患者の口腔内・食道内細菌叢には有意差を認めなかった。健常コントロールとの直接の比較は行っていないが、健常者の食道細菌叢を報告した過去の論文をみると健常者においても *Streptococcus* がの頻度が最も高く、細菌構成も食道アカラシア、食道扁平上皮癌と類似していた。本研究からは食道アカラシアや食道扁平上皮癌に特異的な細菌構成は見いだせなかった。

### **POEM 前後での口腔内・食道内細菌叢の変化**

POEM の前後で 多様性、多様性に有意差は見られなかったが、relative abundance をみると、POEM 後に *Haemophilus* ( $1.3 \pm 1.3\%$  vs  $4.7 \pm 2.7\%$ ;  $P = .046$ ) と *Neisseria* ( $1.3 \pm 1.0\%$  vs  $7.7 \pm 6.6\%$ ;  $P = .028$ ) の割合が有意に増加していた。これらの属種は逆流性食道炎患者の食道で高頻度にみられる細菌であり、POEM の術後合併症である逆流性食道炎のために増加した可能性が考えられた。

### **POEM 前後における食道上皮の内視鏡的・組織学的評価**

POEM 後の内視鏡所見の Grading score に有意な改善がみられた。また、組織学的な炎症所見に関しては POEM 前後で有意差は見られなかった。

### **結論**

食道アカラシア患者における口腔内細菌叢と食道内細菌叢は有意に異なっていた。また POEM 後には食道内で *Haemophilus* と *Neisseria* の割合が有意に増加しており、POEM の合併症である逆流性食道炎の関与が疑われた。しかしながら、POEM 前後で食道内細菌叢の多様性に有意な変化はみられなかった。また食道内細菌叢と食道炎・食道扁平上皮癌発癌の関連は見いだせなかった。内視鏡的な炎症所見は POEM 後に有意に改善しており、食道細菌叢の異常以外の機序（例えば食餌貯留による機械的な刺激など）が慢性的な食道炎と関与している可能性が示唆された。POEM による炎症所見の改善は将来的な発癌予防につながる可能性があり、POEM は発癌予防の観点からも有効である可能性が示唆された。本研究は少数例での検討であり、確定的な結論のためにはより規模の大きな研究が必要と考えられた。

### **< 引用文献 >**

1. Takahashi, K. *et al.* Comparison of Oral and Esophageal Microbiota in Patients with Achalasia Before and After Peroral Endoscopic Myotomy. *Turkish J. Gastroenterol.* **32**, 42-52 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazuya Takahashi, Hiroki Sato, Takeshi Mizusawa, Kentaro Tominaga, Satoshi Ikarashi, Kazunao Hayashi, Ken-Ichi Mizuno, Satoru Hashimoto, Junji Yokoyama, Shuji Terai	4. 巻 32(1)
2. 論文標題 Comparison of Oral and Esophageal Microbiota in Patients with Achalasia Before and After Peroral Endoscopic Myotomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Turk J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 42-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5152/tjg.2020.19995.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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 高橋一也、佐藤裕樹、寺井崇二
2. 発表標題 食道アカラシア患者における口腔-食道内細菌叢の検討
3. 学会等名 第97回日本消化器内視鏡学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------