

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18105

研究課題名(和文)大腸粘液層のバリア機能破綻に着目した炎症性発癌に関する腸内細菌叢の解明

研究課題名(英文) Bacterial composition analysis in colorectal tissue is affected by the degree of mucus adhesion

研究代表者

田島 陽介(Tajima, Yosuke)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：30757505

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)：われわれは、「粘液バリアを突破して内粘液層あるいは組織表面に定着した特定の細菌こそが発癌や癌進展に寄与する」との仮説を立て、それらの特定の細菌を同定するための組織採取法を検討しました。本研究により、以下3つの結果が得られました。1. 外粘液層は生理食塩水による圧洗浄により容易に除去できました。2. 洗浄前の粘液に比して、洗浄後の正常部粘膜および癌部組織で有意に減少する細菌種を複数認めました。3. 正常部・癌部ともに、洗浄前の粘液に比して洗浄後の組織において多様性を示すシャノン多様性指数が低下していました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、外粘液層と内粘液層以深を区別して細菌叢解析を行うことの意義が示されました。内粘液層以深の検体を区別して採取することにより、癌の発生や進展に寄与する可能性がある内粘液層以深に定着する特定の細菌を同定できる可能性が示唆されました。また、癌や正常粘膜の細菌叢を解析する場合には、組織に付着する粘液の程度を考慮して解析を行うべきであることが示唆されました。

研究成果の概要(英文)：On the colorectal epithelium, the outer mucus layer is easily removable and colonized by commensal microbiota. In contrast, the inner mucus layer is firmly attached to the epithelium and devoid of bacteria. Although the specific bacteria penetrating the inner mucus layer can contact epithelial cells and trigger cancer development, most studies do not consider the degree of mucus adhesion at sampling. Therefore, we evaluated whether bacteria adhering to tissues could be identified by removing the outer mucus layer. This study showed three notable results. First, the loose mucus layer on tissues could be well removed by high-pressure washing with sterile saline. Second, the relative abundance of some bacteria was significantly decreased in both cancer and mucosa compared to the mucus covering those tissues. Third, the Shannon diversity index was significantly decreased in both cancer and mucosa compared to the mucus covering those tissues.

研究分野：下部消化管外科

キーワード：腸内細菌叢 大腸癌 粘液 カルノア固定 16S rRNA遺伝子解析 多様性

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管には約 1,000 種、100 兆個以上の腸内細菌が生息し、腸内細菌叢を構成している。腸内細菌の多くが難培養性であるため、培養技術に基づいたこれまでの細菌学的手法では腸内細菌叢の全貌を明らかにすることは困難でした。しかし、16S rRNA 遺伝子解析をはじめとした分子生物学的手法の導入により、ブラックボックスであった腸内細菌叢の組成や機能が急速に解明されてきました。その中で、ヒトにおける腸内細菌叢の異常 (dysbiosis) が炎症性腸疾患や大腸癌をはじめとした種々の疾患と関連することが報告され始めています。

大腸粘液層は、病原細菌の細胞への侵入を防御する高密度の内粘液層と、常在細菌に定着の場を与えている低密度で粘性の高い外粘液層の 2 層に分かれています。内粘液層は通常ほぼ無菌の状態に保たれていますが、腸炎を自然発症するモデルマウスにおいては多くの細菌の内粘液層への侵入や大腸粘膜への定着が認められます。

現在までに、多数の研究がヒト大腸癌と特定の腸内細菌との関連を示してきました。しかし、常在腸内細菌叢が外粘液層に存在することや粘膜表面が通常無菌状態であることを念頭に置いた研究は非常に少ないです。そこでわれわれは、「粘液バリアを突破して内粘液層あるいは組織表面に定着した特定の細菌こそが発癌や癌進展に寄与する」との仮説を立て、それらの特定の細菌を同定するための組織採取法を検討しました。

2. 研究の目的

ヒト大腸癌手術検体における内粘液層あるいは組織表面に定着する細菌を同定することです。

3. 研究の方法

対象：原発性大腸癌に対して切除手術を施行した 18 症例です。

方法：

検体採取方法：手術前日に機械的腸管前処置を行い、その際に便検体を採取しました。手術当日摘出後の癌を含む大腸検体よりただちに癌・正常部の全層および表面粘液を採取しました。癌部および正常粘膜部の表面を生理食塩水により圧洗浄して外粘液層を除去した後に、癌・正常粘膜、および癌・正常部の全層をそれぞれ採取しました。

全層検体のカルノア固定：癌・正常粘膜の全層検体をカルノア固定した後にパラフィン包埋を行いました。癌部・正常部の洗浄前後の粘液層の付着の程度（厚さ）を顕微鏡で測定して比較し、生理食塩水による粘液洗浄の効果を検証しました。

大腸癌部・正常粘膜部の 16S rRNA 遺伝子解析：洗浄前の癌・正常粘膜表面の粘液、洗浄後の癌・正常粘膜、便のそれぞれについて 16S rRNA 遺伝子解析を施行して細菌叢構成を解析しました。

4. 研究成果

癌部・正常部の付着粘液の厚みの比較：正常部において、洗浄前に比べて洗浄後は有意に付着粘液の厚みが減少しました。一方、癌部においては、洗浄前後で付着粘液の厚みに有意差を認めませんでした。洗浄前で癌部と正常部を比較すると、洗浄前では癌部に比べて正常部で付着粘液が厚い傾向を認めました。一方、洗浄後では癌部と正常部で付着粘液の厚みに有意差を認めませんでした。顕微鏡的に観察すると、洗浄により除去されたのは主に外粘液層であり、内粘液層は洗浄後も付着していました。また、癌部においては内粘液層がほぼ消失していました。

癌部・正常部の門レベルにおける細菌アバンダンスの比較：正常部において洗浄前の粘液と洗浄後の粘膜の細菌叢構成を比較すると、洗浄前後でアバンダンスに有意差のある門を認めませんでした。また、癌部において洗浄前の粘液と洗浄後の細菌叢構成を比較すると、洗浄前後でアバンダンスに有意差のある門を認めませんでした。

癌部・正常部の属レベルにおける細菌アバンダンスの比較：正常部において洗浄前の粘液と

洗浄後の粘膜の細菌叢構成を比較すると、Sutterella と Enterobacteriaceae のアバンダンスが粘液に有意に多く、粘膜に有意に多い属を認めませんでした。一方、癌部において洗浄前の粘液と洗浄後の癌部組織の細菌叢構成を比較すると、Rikenellaceae のアバンダンスが粘液に有意に多く、癌部組織に有意に多い属を認めませんでした。また、洗浄前の癌部と正常部の粘液の細菌叢構成をを比較すると、Ruminococcoaceae、Enterobacteriaceae、Erysipelotrichaceae のアバンダンスが正常部の粘液に有意に多く、Fusobacterium のアバンダンスが癌部の粘液に有意に多い結果となりました。一方、洗浄後の癌部と正常部粘膜の細菌叢構成を比較すると、いずれの属のアバンダンスも有意差を認めませんでした。

正常部・癌部の多様性の比較：正常部において、洗浄前の粘液に比べて洗浄後の粘膜のシャノン多様性指数は低下していました。また、癌部においても洗浄前の粘液に比べて洗浄後の癌部組織のシャノン多様性指数は低下していました。一方、洗浄前の正常部と癌部の粘液および洗浄後の正常部粘膜と癌部組織のシャノン多様性指数に有意差を認めませんでした。

【まとめ】

本研究により、以下3つの結果が得られました。

1. 外粘液層は生理食塩水による圧洗浄により容易に除去できました。
2. 洗浄前の粘液に比して、洗浄後の正常部粘膜および癌部組織で有意に減少する細菌種を複数認めました。
3. 正常部・癌部ともに、洗浄前の粘液に比して洗浄後の組織において 多様性を示すシャノン多様性指数が低下していました。

これらのことから、外粘液層と内粘液層以深を区別して細菌叢解析を行うことにより、癌の発生や進展に寄与する可能性がある内粘液層以深に定着する特定の細菌を同定できる可能性が示唆されました。

<引用文献>

- 1) Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002 Jan;122(1):44-54.
- 2) Bullman S, Pedomallu CS, Sicinska E, Clancy TE, Zhang X, Cai D, Neuberger D, Huang K, Guevara F, Nelson T, Chipashvili O, Hagan T, Walker M, Ramachandran A, Diosdado B, Serna G, Mulet N, Landolfi S, Ramon Y Cajal S, Fasani R, Aguirre AJ, Ng K, Élez E, Ogino S, Tabernero J, Fuchs CS, Hahn WC, Nuciforo P, Meyerson M. Analysis of Fusobacterium persistence and antibiotic response in colorectal cancer. *Science*. 2017 Dec 15;358(6369):1443-1448.
- 3) Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, Büller HA, Dekker J, Van Seuningen I, Renes IB, Einerhand AW. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*. 2006 Jul;131(1):117-29.
- 4) Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, Booth CJ, Peaper DR, Bertin J, Eisenbarth SC, Gordon JI, Flavell RA. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*. 2011 May 27;145(5):745-57.

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 田島陽介、花井恒一
2. 発表標題 外科に関連した細菌の腸内細菌叢の話題
3. 学会等名 消化器癌学術講演会2021
4. 発表年 2021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
研究協力者	奥田 修二郎 (Okuda Shujiro)	新潟大学・メディカルAIセンター・教授	
研究協力者	花井 恒一 (Hanai Tsunekazu)	藤田医科大学・総合消化器外科・教授	
研究協力者	廣 純一郎 (Hiro Junichiro)	藤田医科大学・総合消化器外科・准教授	
研究協力者	升森 宏次 (Masumori Koji)	藤田医科大学・総合消化器外科・准教授	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	小出 欣和 (Koide Yoshikazu)	藤田医科大学・総合消化器外科・准教授	
研究協力者	神谷 忠宏 (Kamiya Tadahiro)	藤田医科大学・総合消化器外科・講師	
研究協力者	鄭 栄哲 (Cheong Yoengcheol)	藤田医科大学・総合消化器外科・助教	
研究協力者	稲熊 岳 (Inaguma Gaku)	藤田医科大学・総合消化器外科・助手	
研究協力者	島田 能史 (Shimada Yoshifumi)	新潟大学・消化器・一般外科・講師	
研究協力者	若井 俊文 (Wakai Toshifumi)	新潟大学・消化器・一般外科・教授	
研究協力者	秋元 信吾 (Akimoto Shingo)	藤田医科大学・総合消化器外科・講師	
研究協力者	松岡 宏 (Matsuoka Hiroshi)	藤田医科大学・総合消化器外科・教授	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	宇山 一郎 (Uyama Ichiro)	藤田医科大学・総合消化器外科・教授	
研究協力者	須田 康一 (Suda Koichi)	藤田医科大学・総合消化器外科・教授	

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