

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22651

研究課題名（和文）消化器領域におけるヒト共生細菌叢と宿主の癌遺伝子異常との相互作用の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the interaction between human commensal bacterial flora and host genetic alterations in the digestive tract

研究代表者

若井 俊文（Wakai, Toshifumi）

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50372470

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍組織と非腫瘍組織を抽出し16SrRNA遺伝子の塩基配列を決定した。腫瘍組織と非腫瘍組織に濃縮された細菌が確認された。腫瘍組織内に共存する細菌は宿主細胞内に変異した遺伝子シグナル経路が存在すると濃縮されることが示された。Campylobacterが多く存在する患者は二本鎖DNA切断修復の失敗を示す変異シグネチャー3との関連が示唆された。大腸癌発症には、細菌感染によって放出される物質によるDNA損傷が一因である可能性が示唆された。腸内細菌叢の異なるパターンと宿主特異的な遺伝子変化が明らかになれば、抗がん剤や免疫療法に加えて、マイクロバイオーンを調節するなどの標的治療が可能になる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌に多く存在することが知られているFusobacteriumをはじめとするいくつかの細菌は、非腫瘍組織と比較して腫瘍組織との共生が豊かであることがわかった。腫瘍組織内に共存する微生物群は宿主細胞の遺伝子の変化やシグナル伝達経路の異常がある場合にエンリッチされることが示された。これらの結果から、大腸癌発症は微生物叢の細菌が放出する物質によるDNA損傷やシグナル伝達経路の異常が原因の一つである可能性が示唆された。腸内細菌叢の明確なパターンとその特異的な遺伝子変異を特定することで、抗がん剤や免疫療法に加えてマイクロバイオーンを調節するなど、標的を絞った介入が可能になるかもしれないと考えます。

研究成果の概要（英文）：The tumor and non-tumor tissues were extracted from the patients, and 16S rRNA genes were sequenced for each sample. We identified enriched bacteria in tumor and non-tumor tissues. Furthermore, it was shown that certain bacteria that often coexist within tumor tissue were enriched in the presence of a mutated gene or signal pathway with mutated genes in the host cells. In addition, the patients with a high abundance of Campylobacter were suggested to be associated with mutational signature 3 indicating failure of double-strand DNA break repairs. These results suggest that CRC development may be partly caused by DNA damage caused by substances released by bacterial infection. Taken together, the identification of distinct gut microbiome patterns and their host specific genetic alterations might facilitate targeted interventions, such as modulation of the microbiome in addition to anticancer agents or immunotherapy.

研究分野：消化器外科

キーワード：ヒト共生細菌叢 癌遺伝子異常 消化器 伝播経路 薬物療法 バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

癌の原因は遺伝子異常であることから、世界中で次世代シーケンサー (NGS) を用いた癌遺伝子変異解析が行われ、宿主 (ヒト) 側の癌遺伝子変異のデータは蓄積してきており、消化器癌領域においては、ゲノム創薬の急速な進歩により癌遺伝子変異を同定して、治療効果の見込める薬剤を選択する取り組みが始まっている (Precision Medicine: 精密医療)。NGS 解析では、マイクロサテライト不安定性 (MSI) を評価することでミスマッチ修復機構 (MMR) の破綻を検出可能であり、遺伝子変異数の総和の指標である Tumor Mutation Burden (TMB) も全エクソームシーケンス (約22,500遺伝子) と同等に算出可能であることを報告してきた (Genome Med 2016; Genome Med 2017)。TMBは、免疫チェックポイント阻害薬を用いた免疫療法における治療効果を予測する重要な指標である。近年、腸内細菌叢は宿主 (ヒト) の免疫系に作用して、免疫療法における治療効果と強い相関を示すことが報告されている。しかしながら、現状では、細菌叢と宿主 (ヒト) の癌遺伝子異常との相互作用、細菌叢の伝播経路に関しては未解明な点が多い。その理由は、癌遺伝子異常と対応する細菌叢の情報を統合的に解析した研究が極めて少ないためである。外科手術で得られるサンプルであれば、癌細胞自体とその癌に共生する細菌 (叢) とを同時に取得しゲノム解析可能となる。このような背景から、癌の遺伝子異常と癌に共生する細菌 (叢) とを同時に網羅的かつ統合的にゲノム解析することで、その相互作用を解明するという着想に至った。遺伝子変異に対してゲノム編集技術を治療として用いることは技術的にも倫理的にも困難である。一方、宿主 (ヒト) にとって良い影響を与える方向に細菌 (叢) を能動的に変化させることは理論上可能であり (細菌叢の改変調節)、健康医療への展開に繋がると考えられている。このような概念を癌治療に応用するためには、癌遺伝子変異 (癌発生の要因) と細菌叢 (宿主の免疫、薬剤感受性に関与) との統合的な解析から相互作用を究明し癌の病態を正確に把握することが必要である。以上により、本研究は学術的にも社会的にも重要な研究開発課題であると考え、本研究開発課題を企画し立案した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、「癌遺伝子変異データ、細菌叢ゲノムデータを高次元解析し、癌に関連する細菌叢バイオマーカー及び薬物療法における治療効果の予測が可能となる細菌叢バイオマーカー同定すること」である。ヒト共生細菌叢も考慮した癌治療に役立つ知識データベースを駆使して、臨床応用に向けた Microbiome-based Precision Medicine (細菌叢を基盤とした精密医療) という細菌叢に着目した新たな治療体系の礎を築くことを目指す。腹腔内臓器から発生する消化器癌 (食道癌、胃癌、胆道癌、膵癌、大腸癌) の病態に深く関与する癌遺伝子変異 (癌発生の原因) と、癌組織内および癌組織周辺の細菌叢 (宿主の免疫、薬剤感受性に関与) とを同時にゲノム解析し、更に各臓器から分泌される消化液 (唾液、胃液、胆汁、膵液、腸液、糞便) 中の細菌 (叢) もゲノム解析することで、同一宿主 (ヒト) の癌遺伝子変異解析データ、細菌叢ゲノム解析データを取得する。消化器癌における癌遺伝子異常と関連する細菌叢のゲノム解析結果に加え、臨床情報データベースと統合した知識データベースを開発し、ヒト共生細菌叢と宿主の癌遺伝子異常との相互作用を究明するための高次元データ解析を可能とするプラットフォームを構築する。

### 3. 研究の方法

新潟大学医学部の倫理委員会は、本研究のプロトコル (G2015-0816) を承認し、すべての患者から書面によるインフォームド・コンセントを得ました。ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルを NGS に使用し、ステージ I~IV の大腸癌患者を対象に、腫瘍組織の遺伝子変異を評価しました。まず、50~150ng の DNA フラグメントライブラリーを調製し、415 遺伝子のパネルでエンリッチしました。Illumina MiSeq および NextSeq プラットフォームを使用し、平均シーケンス深度 500 を達成しました。パイオインフォーマティクスプラットフォームと知識データベースを用いて、「ゲノムデータを処理し、一塩基変異 (SNV)、微小な挿入/欠失 (indel)、コピー数変異 (CNV)、転座などのゲノム異常を同定しました。腫瘍のみの環境で変異の体細胞状態を評価するために、以前に発表されたものと同様のフィルタリング戦略を採用しましたが、若干の変更を加えました。すなわち、各データベースに存在する変異の優先順位のカットオフ値を  $AF > 1\%$  に下げました。次に、各変異の対立遺伝子の頻度を用いてモデルを当てはめ、その変異が生殖細胞のヘテロ接合である可能性が高いか、体細胞であるかを判断しました。SNV とインデルについては 10% の対立遺伝子の割合の閾値を用い、gain と loss についてはそれぞれ 2.5 倍以上と 0.5 倍未満の閾値を用いました。解析の段階で腫瘍部から非腫瘍部を引き算することで、腫瘍内細菌叢を特定しています。Neijman ニーマンらが報告した先行研究で同定された種をもとに、本研究で得られた種から contamination 種を除去しました。contamination の種名と一致する種名をフィルタリングした後、残りの種の相対存在量を 1.0 に正規化して再計算しました。上流の分類学レベルでの相対存在量は、種レベルで再計算された相対存在量に基づいて再推定されました。腫瘍部でエンリッチしている細菌を同定するために、One-sided Wilcoxon 順位和検定を用いて、腫瘍部と非腫瘍部における各分類群の相対的なアバundanceを検定しました。

さらに、細菌の分類群と遺伝子変異、またはシグナルパスウェイと遺伝子変異との関連を調べるために、別のエンリッチメント分析を行いました。ゼロ値のケースを考慮して、腫瘍組織における細菌分類群の相対的なアバundanceから非腫瘍組織における相対的なアバundanceを差し引いて差を算出しました。ある細菌が遺伝子変異の有無によってエンリッチされているかどうかを確認するために、患者を宿主側の遺伝子変異の有無に基づいてグループに分けました。両者の相対的なアバundanceの違いを、片側 Wilcoxon 順位和検定を用いて検証しました。同様に、宿主側のシグナル経路に関与する遺伝子群における遺伝子変異の有無に基づいて患者をグループ分けし、それらの相対的なアバundanceの差を片側 Wilcoxon 順位和検定を用いて検定した。計算には R を用い、正確な Rank Tests ライブラリも併せて使用しました。臨床データと各細菌属との関連性を検証するために、腫瘍組織と非腫瘍組織における各細菌属のアバundanceの差を応答変数とし、臨床データを共変数として、多変量一般化線形回帰を行いました。各 SNV は、一塩基変異の位置までのヌクレオチド 5 と 3 からなる配列コンテキストに基づいて、96 個の可能な置換のマトリックスに分類されました。変異シグネチャーは、「Somatic Signatures」ライブラリを用いた non-negative の行列因子分解分析により抽出し、R の「ggplots」ライブラリを用いてプロットしました。エンリッチメント解析で得られた、エンリッチされた分類群や遺伝子変異の相対量や P 値のパターンを比較するために、R のユークリッド距離と Ward's オード法を用いて、階層的なクラスタリングを行いました。

#### 4. 研究成果

1. 腫瘍組織と非腫瘍組織のマイクロバイオームの比較では、Fusobacterium、Peptostreptococcus、Campylobacter を含む 12 属が、腫瘍組織で正にエンリッチされていることがわかりました。一方、Bacteroides、Clostridium を含む 11 属は、非腫瘍組織に比べて腫瘍組織での相対的なアバundanceが低いことがわかりました。
2. ヒートマップは、属レベルの分類学と遺伝子変異との間のエンリッチメント分析の P 値を示しています。腫瘍サンプルと非腫瘍サンプルを比較したエンリッチメント解析で見つかった分類群について、非同義の SNV、Indels、CNV、転座などの遺伝子変異の有無について、患者を対象としたさらなるエンリッチメント解析を行いました。変異頻度が 15%以上、遺伝子変異している患者が 5 人以上の場合はフィルターで除外し、その後、階層的なクラスタリングを行いました。Streptococcus は ATM の変異と最も有意な関連を示し、Treponema トレポネマは SPEN と IGF2R の変異と有意な関連を示し、Peptostreptococcus は MEN1 と AKT1 の変異と有意な関連を示していました。カンピロバクターは TNK2 と GATA2、セレノモナスは MEN1 と PIK3CD の変異と関連していました。
3. 特定のシグナル伝達経路に関わる遺伝子変異が見られた患者では、いくつかの細菌属が有意にエンリッチされていることがわかりました。Campylobacter と Selenomonas は、PI3K シグナル伝達および補体活性化のシグナル伝達経路の遺伝子変異と関連していました。Fusobacterium と Streptococcus は、細胞周期系の遺伝子変異と関連していました。また、Fusobacterium は、NOTCH シグナル、AHR-細胞周期調節など、他のシグナル伝達経路とも有意に関連していました。Peptostreptococcus は TNF シグナル、Ruminococcus はアポトーシスと有意に関連していました。
4. Campylobacter の相対的なアバundanceが、腫瘍組織では非腫瘍組織に比べて高いか低いかで、患者を 2 つのグループに分類して、変異シグネチャー解析を行いました。その結果、シグネチャー 1、3、6、22 が検出されました。シグネチャー 1 はがん診断の年齢と関連し、シグネチャー 3 は相同組換えによる DNA 二重鎖切断修復の failure と関連する変異シグネチャー、シグネチャー 6 は DNA ミスマッチ修復の欠陥と関連し、シグネチャー 22 は COSMIC データベースのアリストロキア酸に暴露されたがんサンプルと関連します。その結果、Campylobacter-high グループでは、Campylobacter-low グループに比べて Signature 3 の割合が非常に高いことがわかりました。これらの結果は、Campylobacter が合成した DNA 病変毒素による遺伝子変異の可能性を示しています。
5. 宿主(ヒト)における各種体液(唾液、胃液、胆汁、膵液、腸液、糞便)中の細菌叢もターゲットにして、胆道癌、膵癌における各種体液(唾液、胃液、胆汁、膵液、腸液、糞便)中の細菌叢を 16S rRNA 遺伝子解析した結果について英語論文を執筆し投稿中である。

大腸癌に多く存在することが既に知られている Fusobacterium をはじめとするいくつかの細菌は、非腫瘍組織と比較して腫瘍組織との共生がリッチであることがわかりました。さらに、腫瘍組織内にしばしば共存する微生物群は、宿主細胞の遺伝子変異やシグナル伝達経路の異常がある場合にエンリッチされることが示されました。これらの結果から、大腸癌の発生は、微生物叢の細菌が放出する物質による DNA 損傷やシグナル伝達経路の異常が原因の一つである可能性が示唆されました。これらの結果を総合すると、腸内細菌叢の明確なパターンとその特異的な遺伝子変異を特定することで、抗がん剤や免疫療法に加えてマイクロバイオームを調節するなど、標的を絞った介入が可能になるかもしれないと考えます。

This study was published by Comput Struct Biotechnol J. 2021 Jun 4;19:3330-3338.

RE: Okuda S, Shimada Y, Tajima Y, Yuza K, Hirose Y, Ichikawa H, Nagahashi M, Sakata J, Ling Y, Miura

N, Sugai M, Watanabe Y, Takeuchi S, Wakai T. Profiling of host genetic alterations and intra-tumor microbiomes in colorectal cancer. *Comput Struct Biotechnol J.* 2021 Jun 4;19:3330-3338. doi: 10.1016/j.csbj.2021.05.049. PMID: 34188781; PMCID: PMC8202188.

I will present our research published in your Journal (*Comput Struct Biotechnol J.* 2021 Jun 4;19:3330-3338) at the conference, The 32nd Annual Meeting of the Japanese Society for Gastroenterological Carcinogenesis on November 26, 2021.

Since this society publishes a proceedings (abstracts), we request permission to reprint the abstract of *Comput Struct Biotechnol J.* 2021 Jun 4;19:3330-3338.

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 Okuda S, Shimada Y, Tajima Y, Yuza K, Hirose Y, Ichikawa H, Nagahashi M, Sakata J, Ling Y, Miura N, Sugai M, Watanabe Y, Takeuchi S, Wakai T	4. 巻 19
2. 論文標題 Profiling of host genetic alterations and intra-tumor microbiomes in colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Comput Struct Biotechnol J	6. 最初と最後の頁 3330-3338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.csbj.2021.05.049.	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 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Toshifumi Wakai, Shujiro Okuda, Yoshifumi Shimada, Yosuke Tajima, Yuki Hirose, Hiroshi Ichikawa, Yiwei Ling, Nobuaki Miura, Mika Sugai, Yu Watanabe, Shiho Takeuchi, Jun Sakata
2. 発表標題 Profiling of host genetic alterations and intra-tumor microbiomes in colorectal cancer 大腸癌における宿主の遺伝子変異と腫瘍内細菌叢のプロファイリング
3. 学会等名 The 32nd Annual Meeting of the Japanese Society for Gastroenterological Carcinogenesis（招待講演）（国際学会）
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
研究分担者	奥田 修二郎  (Okuda Shujiro)  (00512310)	新潟大学・医歯学系・准教授    (13101)	
研究分担者	坂田 純  (Sakata Jun)  (70447605)	新潟大学・医歯学系・講師    (13101)	
研究分担者	島田 能史  (Shimada Yoshifumi)  (20706460)	新潟大学・医歯学系・助教    (13101)	

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
研究分担者	永橋 昌幸 (Nagahashi Masayuki)  (30743918)	新潟大学・医歯学総合病院・研究准教授  (13101)	
研究分担者	市川 寛 (Ichikawa Hiroshi)  (50721875)	新潟大学・医歯学系・助教  (13101)	
研究分担者	廣瀬 雄己 (Hirose Yuki)  (10737365)	新潟大学・医歯学総合病院・特任助教  (13101)	
研究分担者	油座 築 (Yuza Kizuki)  (00745565)	新潟大学・医歯学総合病院・専任助教  (13101)	削除：2020年10月12日

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