

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03662

研究課題名(和文) 家族性大腸腺腫症を対象にしたメタゲノム解析とそれに基づく大腸癌発症進展機構の解明

研究課題名(英文) Metagenomic analysis of familial adenomatous polyposis and its implications for understanding the pathogenesis of colorectal cancer

研究代表者

谷内田 真一 (Yachida, Shinichi)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20359920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：大腸腺腫症(FAP)患者の未手術者を対象に「凍結便」と「生活習慣などに関するアンケート」を収集した。凍結便を用いてショットガンメタゲノム解析とメタボローム解析を行った。FAP患者と健常者を年齢と性別をマッチさせて、腸内細菌と腸内代謝物質を比較したところ、FAP患者に特徴的な腸内細菌や代謝物質を特定することができた。さらにFAP患者内での個人差をDirichlet multinomial mixtures (DMM) モデリングで分類した。FAPの悪性度(最大腫瘍径、ポリープ数、組織学的悪性度、密生型病変の有無等)と照合したところ、関連するDMMでの一群が特定出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌におけるFirst hitとなる遺伝子異常はAPC遺伝子の変異である。FAP患者はこのAPC遺伝子の生殖細胞系変異を有している。散発性大腸癌の自然史は約20年であることから、大腸癌の原因となる環境因子(腸内細菌など)を特定することは困難である。一方、FAP患者においては発癌までの期間が短いため、FAP患者における腸内環境の変化を解析することで、短期間で効率的に発癌における環境因子の影響を解明することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Stool samples and lifestyle questionnaires were obtained from unoperated patients diagnosed with familial adenomatous polyposis. Frozen stool samples were subjected to shotgun metagenomic and metabolomic analyses in order to compare intestinal bacteria and metabolites associated with patients diagnosed with FAP and age- and sex-matched healthy controls. Subsequently, individual variances among FAP patients were categorized using Dirichlet multinomial mixtures (DMM) modeling. This led to the identification of a specific group with corresponding DMMs when matched with FAP grade, encompassing factors such as maximum tumor diameter, number of polyps, histologic grade, and presence of dense lesions.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：腸内細菌 大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食事などの生活習慣の欧米化に伴い、がん種の欧米化が進んでいる。2014年には大腸癌が胃癌を抜いて、本邦における罹患数が最多のがん種となった。生活習慣の欧米化と大腸癌の発症を結ぶ分子機構については未だ十分に解明されていないが、食事などの環境因子による細菌叢の変化が腫瘍の発癌機構に関与している可能性が、モデル動物等の検討から示唆されている。加えて、腸内細菌叢が宿主の代謝調節やシグナル伝達に不可欠で、腸管免疫系の分化誘導にも密接に関与し、炎症性腸疾患や肥満、糖尿病などの様々な疾患の発症に関与する可能性が相次いで報告されるようになった。

研究代表者らは、これまでに散发性大腸癌と関連する腸内細菌や腸内代謝物質を同定し報告してきた (Yachida S et al. Nat Med. 2019, 25: 968)。散发性大腸癌の多段階発癌過程において、腺腫から超早期癌(粘膜内癌)と進行癌では増減する便中の腸内細菌や代謝物質は異なり、腫瘍発生段階よりダイナミックに変動することを発見した。

一方、遺伝性大腸癌(家族性大腸腺腫症とリンチ症候群)における腸内環境はほとんど知られていない。家族性大腸腺腫症(FAP, Familial adenomatous polyposis)は、APC遺伝子の生殖細胞系変異を原因とし、大腸の多発性腺腫を主徴とする常染色体優性遺伝性の症候群である。大腸癌の発生は40歳代で約50%、放置すれば60歳頃にはほぼ100%に達する。その頻度は本邦では約6人/10万人と希少であり、欧米とほぼ同数である。確実な治療法は大腸癌を発生する前に大腸切除を行うこと(予防的大腸切除)である。一般的に20歳代で手術を受けることが多い。大腸(亜)全摘・回腸囊肛門(管)吻合術が標準術式とされ、施行される割合も多い。国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)革新的がん医療実用化研究事業としてFAPに対する「大腸ポリープ徹底的摘除による大腸癌予防臨床試験(J-FAPP Study)」が行われている。本研究対象は大腸に腺腫が100個以上ある(または、あった)者であり、かつ手術を勧めたが手術を望まなかった患者である。FAPの腺腫を可能な限り摘除することで大腸癌発生を予防・遅延できるかの臨床介入試験である。研究代表者の谷内田真一は、この臨床介入試験に登録されfollow-upされている患者を対象に経時的に大腸内視鏡検査の際に凍結便を収集してきた。FAP患者は上述のように加齢とともに腺腫から大腸癌に進展するが、その機構は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、FAP患者における腸内環境を明らかにすることである。本疾患は希少であり、多くの症例は20歳代で大腸(亜)全摘を行うため、未開の研究領域である。FAP患者における経時的な腸内環境を観察することは通常極めて難しいが、研究代表者らはFAPに対する上述の「大腸ポリープ徹底的摘除による大腸癌予防臨床試験」に登録された患者を対象とすることでこれを可能とした。

第二の目的は多発腺腫から大腸癌に至る過程における腸内環境の変動を観察し、動物実験等でそれを検証することである。FAP患者以外においても加齢とともに生涯で3人に1人は腺腫を有する。FAP患者を対象に研究を進めることで、発癌の環境因子と考えられる腸内細菌や腸内代謝物質の影響をより顕著な変化として捉えることができる可能性がある。つまり本研究手法は腸内細菌や腸内代謝物質の変動が発癌に及ぼす影響を効率的に観察するアプローチになることが期待できる。FAP以外の散发性大腸癌は本邦において急増しており、本成果がその発癌メカニズムの解明につながり、大腸癌の発症予防や癌になる前に腸内環境を変える先制医療の実現を目指している。

3. 研究の方法

1) FAP患者を対象とした「生活習慣などに関するアンケート調査」と「凍結便」収集

FAP患者のリクルートを継続して行う。食事等の「生活習慣などに関するアンケート」調査と凍結便試料を収集する。便試料は同一患者から、大腸ポリープ徹底的摘除術の際に定期的(4~8ヶ月)に継続して採取する。

2) 便試料を用いたメタゲノムならびにメタボローム解析

便試料はMetaHIT(Metagenomics of the Human Intestinal Tract)プロトコールにしたがってDNAを抽出する。DNAからのメタゲノム解析(全ゲノムショットガンシーケンス)用ライブラリ作製は、Nextera XT(illumina社)を用いる。qPCRでライブラリの定量を行い、高速シーケンサー:NovaSeq 6000(illumina社)を用いてシーケンスランを行う。

メタボローム解析は慶應義塾大学先端生命科学研究所(山形県・鶴岡市)で研究協力者の福田真嗣 特任教授とともに進行。凍結便の入った匿名加工化番号ラベルを貼付したチューブを凍結したまま送付し、代謝物を抽出した後にキャピラリー電気泳動・質量分析計(CE-TOF/MS, capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry)を用いて代謝物質(アミノ酸、核酸、ペプチド、ビタミンや短鎖脂肪酸の一部)を測定する。

3) 包括的なデータ情報解析

メタゲノム・データからは、生物種のみならず、異種間の相同遺伝子のゲノム情報(KEGG Orthology, KO)やKEGG Module(代謝パスウェイ解析など)が得られる。さらにメタボローム・データ(代謝物質の網羅的データ)、「生活習慣などに関するアンケート」データと臨床情報

を組み合わせると、巨大で複雑なデータ集合の集積物、ビックデータとなる。これらのデータの保持および計算サーバとして大阪大学医学系研究科のスーパーコンピューターを利用し、研究協力者の山田拓司 准教授（東京工業大学）と協働で包括的な情報解析を行う。FAP患者に特徴的な腸内細菌種もしくは腸内細菌の遺伝子配列等を同定する。FAP患者と年齢や性別をマッチさせた健常者群、多発腺腫患者群や大腸癌患者群におけるこれらの菌種や遺伝子配列の相対的存在量を比較検討する。さらに、FAP患者を経時的に観察することで、大腸癌を発症した症例とそうでない症例におけるこれらの差異を比較・検討する。

4) 発癌機構の実証的研究

発がん機構の実証的検証を行うために、*in vitro*技術、すなわち標的とする菌種の試験管または培養槽における培養と動物を用いた *in vivo* 実験を行う。まず FAP患者に特徴的な腸内細菌種を、嫌気性培養等を駆使して分離し、臨床単離株を樹立する。*in vivo* 実験として、新たに特定した細菌を無菌マウスもしくは SPF 環境下で飼育したマウスに、それぞれ定着実験を行う。その後 *Apc*^{min/+}マウスを使用する。*Apc*^{min/+}マウスは FAP患者と類似した遺伝学的背景があり、本研究には極めて有用と考える。新たに特定した細菌を *Apc*^{min/+}マウスに定着させることで、腫瘍発生が促進されるか否か、腺腫を癌化させるか否かを検討する。候補細菌がどのような代謝経路で何を合成もしくは分解することで、大腸腫瘍にどのような影響を及ぼすかを、さらに分子生物学的手法を用いて解析する。

4. 研究成果

家族性大腸腺腫症（FAP）の患者を対象に、「凍結便」とアンケート（JPHC-NEXT（The Japan Public Health Center-based Prospective Study for the Next Generation：次世代多目的コホート研究）を雛形にした「生活習慣などに関するアンケート」）の収集、臨床データの集積を国立がん研究センター・中央病院等で実施した。これらの対象者は定期的大腸内視鏡検査を実施し、上述の大腸ポリープ徹底摘除術を受けていることから、検査（摘除術）の都度に凍結便の複数回収集を行った。

FAP患者においてポリープが病理組織学的に腺腫のみの症例と粘膜内癌を併発する（もしくははした）症例がある。これらを二群に分けて、食事などの生活習慣を比較したところ、食生活 Aが、この二群で統計学的有意な差があることが明らかになった。

収集した便を用いてメタゲノム解析（全ゲノム ショットガン・シークエンス解析）とメタローム解析（CE-TOF/MS）を行い、網羅的な腸内環境を検討した。FAP患者は若年者が多いことから、コントロールの健常者（大腸内視鏡検査で特記事項を認めない人）群と年齢や性別をマッチさせて、FAP患者に特徴的な細菌（群）や代謝物質を検討した。その結果、FAP患者に特徴的な細菌群（増加している細菌と減少している細菌）と代謝物質（多くは増加）を特定した。

FAP患者に特徴的な細菌群を対象に細菌種横断的にKO解析を行った。その結果、FAP患者に特徴的なKOとKEGG pathwayを特定できた。これらは腸管上皮のバリアや免疫システムに関与することが知られており、興味深い結果を得た。

次にFAP患者の初回便を用いて、メタゲノム解析データからDirichlet multinomial mixtures（DMM）モデリングを行った。その結果、FAP患者の便は3群に分類することが出来た。DMMによる亜分類とFAPの悪性度（ポリープの組織学的悪性度、ポリープ数、最大ポリープ径、密生型病変の出現など）を比較した。その結果、細菌属Bが主体なDMM分類の一群が、悪性度と強く関連していることが明らかとなった。

FAP患者のうち経時的（2～10回/症例）に凍結便を収集した症例を対象にメタゲノム解析データの検討を行った。多くのFAP症例においては腸内細菌の組成は安定し（個人内変動はなく）大きな変化は観察されなかった。一方、上述のFAP悪性化を経過観察中に発症した患者においては、ダイナミックな菌相組成の変動を認めた。

FAP患者の特徴的な細菌の臨床単離株の樹立を、当該便の相対存在量が多い患者から嫌気性培養等を駆使し、試行錯誤の上で成功した。その後無菌化遺伝子改変マウス（*Apc*^{min/+}マウス）への定着実験（ノトバイオームマウス）を行った。しかし、想定外に候補細菌の定着が無菌化マウスには悪いことが判明した。遺伝子改変マウスの飼育条件を無菌からSPF環境下に変え、3種の抗生物質（Ampicillin + Neomycin + Vancomycin）を経口投与し腸内細菌叢除去を行った後に、候補細菌を週3回の経口投与（胃ゾンデ）を5週間実施した。その結果、候補細菌投与群ではコントロール群（Mock）と比較して、2 mm以上の大腸ポリープが増加することを解明し、非臨床的PoCを取得することが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shiroma H, Shiba S, Erawijantari PP, Takamaru H, Yamada M, Sakamoto T, Kanemitsu Y, Mizutani S, Soga T, Saito Y, Shibata T, Fukuda S, Yachida S, Yamada T.	4. 巻 Mar 21
2. 論文標題 Surgical treatment for colorectal cancer partially restores gut microbiome and metabolome traits	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mSystems	6. 最初と最後の頁 e0001822
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/msystems.00018-22.	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 -
1. 著者名 1.Erawijantari PP, Mizutani S, Shiroma H, Shiba S, Nakajima T, Sakamoto T, Saito Y, Fukuda S, Yachida S, Yamada T.	4. 巻 69
2. 論文標題 Influence of gastrectomy for gastric cancer treatment on fecal microbiome and metabolome profiles.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 1404-1415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/gutjnl-2019-319188.	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 -
1. 著者名 Narii Nobuhiro, Zha Ling, Sobue Tomotaka, Kitamura Tetsuhisa, Komatsu Masayo, Shimomura Yoshimitsu, Shiba Satoshi, Mizutani Sayaka, Yamada Takuji, Yachida Shinichi	4. 巻 20
2. 論文標題 Intestinal Bacteria Fluctuating in Early-Stage Colorectal Cancer Carcinogenesis are Associated with Diet in Healthy Adults	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nutrition and Cancer	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） 10.1080/01635581.2024.2344257	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 Rynazal Ryza, Fujisawa Kota, Shiroma Hirotsugu, Salim Felix, Mizutani Sayaka, Shiba Satoshi, Yachida Shinichi, Yamada Takuji	4. 巻 24
2. 論文標題 Leveraging explainable AI for gut microbiome-based colorectal cancer classification	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genome Biology	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13059-023-02858-4	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 -

1. 著者名 Narii Nobuhiro, Zha Ling, Sobue Tomotaka, Kitamura Tetsuhisa, Shiba Satoshi, Mizutani Sayaka, Yamada Takuji, Yachida Shinichi	4. 巻 16
2. 論文標題 Association Between Diet and Fusobacterium nucleatum in the Feces of Healthy Adults: A Hospital-based Cross-sectional Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Prevention Research	6. 最初と最後の頁 119 ~ 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1940-6207.CAPR-22-0399	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 Shimomura Yoshimitsu, Zha Ling, Komukai Sho, Narii Nobuhiro, Sobue Tomotaka, Kitamura Tetsuhisa, Shiba Satoshi, Mizutani Sayaka, Yamada Takuji, Sawada Norie, Yachida Shinichi	4. 巻 152
2. 論文標題 Mediation effect of intestinal microbiota on the relationship between fiber intake and colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1752 ~ 1762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.34398	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 Inamura Kentaro, Hamada Tsuyoshi, Bullman Susan, Ugai Tomotaka, Yachida Shinichi, Ogino Shuji	4. 巻 71
2. 論文標題 Cancer as microenvironmental, systemic and environmental diseases: opportunity for transdisciplinary microbiomics science	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 2107 ~ 2122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2022-327209	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 Matsushita Makoto, Fujita Kazutoshi, Motooka Daisuke, Hatano Koji, Hata Junya, Nishimoto Mitsuhiro, Banno Eri, Takezawa Kentaro, Fukuhara Shinichiro, Kiuchi Hiroshi, Pan Yue, Takao Toshifumi, Tsujimura Akira, Yachida Shinichi, Nakamura Shota, Obara Wataru, Uemura Hirotsugu, Nonomura Norio	4. 巻 40
2. 論文標題 Firmicutes in Gut Microbiota Correlate with Blood Testosterone Levels in Elderly Men	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The World Journal of Men's Health	6. 最初と最後の頁 517 ~ 517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5534/wjmh.210190	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 Matsushita Makoto, Fujita Kazutoshi, Motooka Daisuke, Hatano Koji, Fukae Shota, Kawamura Norihiko, Tomiyama Eisuke, Hayashi Yujiro, Banno Eri, Takao Tetsuya, Takada Shingo, Yachida Shinichi, Uemura Hirotsugu, Nakamura Shota, Nonomura Norio	4. 巻 112
2. 論文標題 The gut microbiota associated with high Gleason prostate cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3125 ~ 3135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14998	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4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 谷内田真一
2. 発表標題 がんとメタゲノム
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷内田真一
2. 発表標題 新たな暴露評価に向けたエビデンスの構築：腸内細菌とがん
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shinichi Yachida
2. 発表標題 Human Fecal Microbiome-Based Biomarkers for Colorectal Cancer
3. 学会等名 2021 JCA-AACR International Conference for Precision Cancer Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinichi Yachida
2. 発表標題 Human Gut Microbiota and Colorectal Cancer
3. 学会等名 2023 JCA-AACR International Conference for Precision Cancer Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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			
米国	ハーバード大学			