

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16963

研究課題名（和文）フソバクテリウムが大腸発がんに及ぼす影響の検証 -オルガノイドを用いて-

研究課題名（英文）Examining the Influence of Fusobacterium on Colon Carcinogenesis and Progression - Using Organoids from Clinical Specimens.

研究代表者

松浦 哲也 (Matsuura, Tetsuya)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：10784845

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト大腸癌のオルガノイドにフソバクテリウムを感染させるとオルガノイドに形態変化が起こり、細胞の増殖能や遊走能が向上することを、RT-PCR、蛍光免疫染色、ウェスタンブロッティングを用いて証明した。そのオルガノイドをマウス脾臓に移植すると数週間で肝転移が得られる。フソバクテリウムの影響により転移巣の数や体積は増えたように見えた。今後、マウスの個体数を増やし統計学的な検証が必要である。本研究によりフソバクテリウムが上皮間葉転化の促進を通じて大腸がんの転移に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国立がん研究センターが公表している2020年のがん統計のまとめによると、大腸がんの死亡数の順位は男性で3位、女性では1位で、今後も死亡数が増えていくことが予想される。大腸癌は他の癌種よりも様々な治療選択枝があるものの十分とは言えず、フソバクテリウムが大腸癌の発癌や進展に与える影響を解明できれば、フソバクテリウムが新しい治療ターゲットになりえる可能性がある。本研究はその一端を示すことができたと考えており、本研究を基礎から臨床に広げていくことが重要であると考えている。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated that infection of the organoids from human colon cancer with Fusobacterium causes morphological changes and increases the proliferative and migratory capacity of the cells using RT-PCR, fluorescent immunostaining, and Western blotting. The organoids were transplanted into the spleen of mice. Within weeks, liver metastasis appeared. The number and volume of metastases appeared to increase under the influence of Fusobacterium. Further statistical verification is needed by increasing the number of mice. This study suggests that Fusobacterium contributes to colorectal cancer metastasis through promotion of epithelial-mesenchymal transition.

研究分野：消化器内科

キーワード：大腸癌 オルガノイド フソバクテリウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Fusobacterium nucleatum は口腔内常在菌であるがしばしば大腸がん局所に存在し、大腸発がんとの進展に寄与していることが示唆されている。*H. pylori* の研究が胃がん治療のブレイクスルーをもたらしたように、フソバクテリウムの研究が大腸がん治療のブレイクスルーをもたらすことが期待される。しかしこれまでのフソバクテリウムに関する報告の多くは断片的であり、また再現性に欠け、この菌が大腸発がんや進展にどのように寄与しているのか、以前として全体像は明らかになっていない。

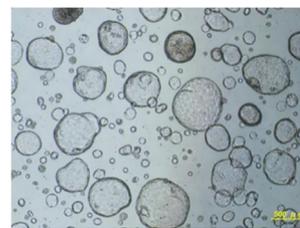
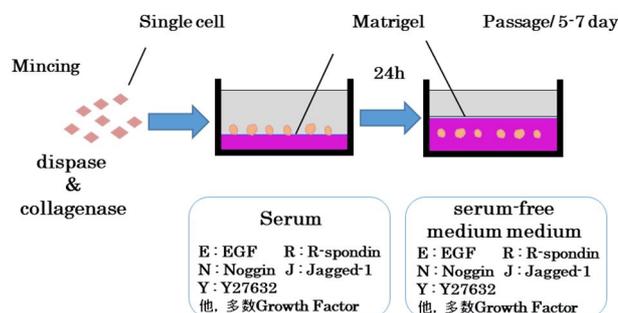
2. 研究の目的

そこで大腸がんとフソバクテリウムの関係について簡便かつ再現性をもって検証できるモデルを確立し、フソバクテリウムが大腸発がんとの進展にもたらす影響を評価したい。大腸がんオルガノイドは臨床検体から樹立し、フソバクテリウムは口腔内もしくは大腸がん検体から分離した株を用いることで、より生体内に近い環境を再現する。そしてフソバクテリウムが大腸がんの治療戦略において新しい治療ターゲットになり得るかどうか評価を行う。

3. 研究の方法

- A) 臨床検体(内視鏡検体)から大腸オルガノイドを樹立し、安定的な継代ができるような培養条件の検討と技術を確立する。これまでの既報を参考、改変した。 Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H. *Gastroenterology*. 2011 Nov;141(5):1762-72
- B) 大腸がんオルガノイドにフソバクテリウムを感染させる。感染後から経時的に表現型の観察を行い、RT-PCR、免疫染色、ウエスタンブロッティング等によりフソバクテリウムによってもたらされた変化を分子生物学的な側面からも検証する。特に浸潤・転移能の獲得につながる上皮間葉転換に注目した。
- C) マウス脾臓に大腸がんオルガノイド移植し肝転移を生じさせる転移モデルを作成した。フソバクテリウムの感染の有無により浸潤、転移能に有意差があるかどうかを評価した。

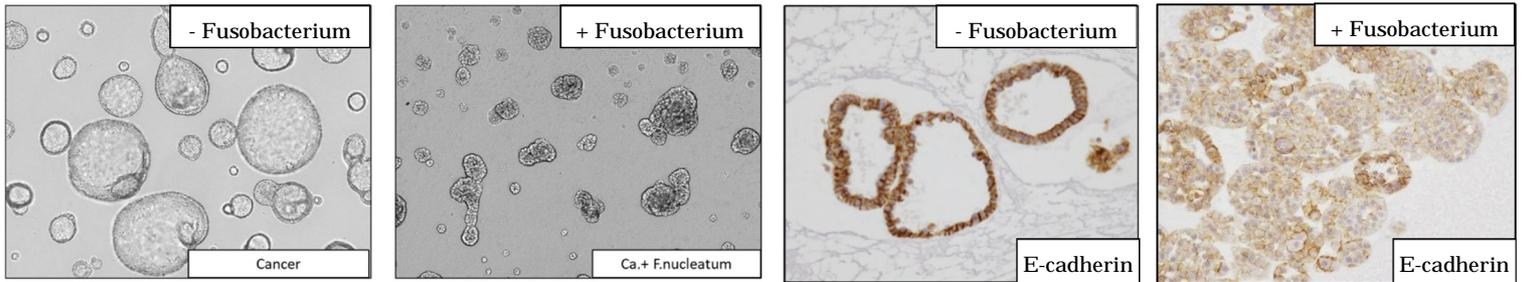
4. 研究成果



大腸癌オルガノイド

検討を重ね臨床検体からオルガノイドを樹立する方法を確立した。検体は1,2 mm角程度の微小な組織片で十分で12 wellプレート2wellに広げると丁度よい密度である。がん、腺腫からのオルガノイドの樹立にはWnt経路のファクターは不要であった(必須とされることが多い)。成功率は、55.6%(10/18)であり、回数を重ねるごとに樹立率は向上した。

大腸がんオルガノイドの継代時にフソバクテリウムを感染させた。フソバクテリウムは適切な濃度に調整し菌数をそろえた。フソバクテリウムを感染させることにより、細胞増殖が亢進するが、これは大腸がんオルガノイドに特有の事象であり、正常大腸と腺腫由来のオルガノイドでは確認できなかったのは興味深い。RT-PCR では Cyclin D1、c-Myc、Ki67 といった細胞増殖マーカーの増加が確認された。またフソバクテリウムを感染させることでバルーン状に発育するはずのオルガノイドが桑実状に発育するというダイナミックな変化があった。HE 染色をすると細胞間のタイトジャンクションのゆるみと内腔への細胞の増殖が観察され、細胞の浸潤、遊走能の獲得が形態の変化をもたらしたのではないかと仮説に至った。

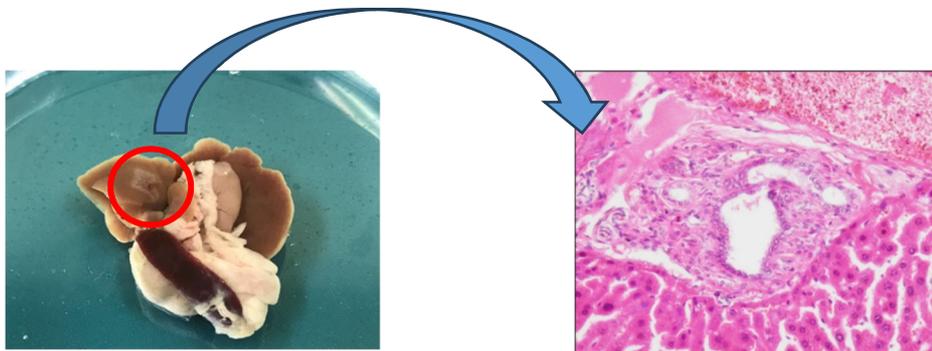


オルガノイドの形態変化

E - cadherin 免疫染色

スクラッチテストを行い細胞の遊走能を評価すると、フソバクテリウム感染の前後で大きな差を認め、再現性があった。顕著な遊走能の亢進、すなわち転移能の獲得につながるこの現象は、上皮間葉転化にフソバクテリウムが関与している可能性を示唆する。感染させたオルガノイドの免疫染色を行うと、上皮系マーカーである E-cadherin は発現が低下し、間葉系マーカーである N-cadherin は発現が軽度上昇していた。他の α -SMT や Vimentin といった間葉系マーカーの免疫染色は条件検討中である。

ヌードマウス脾臓にがん由来のオルガノイドを移植し肝転移させるモデルを樹立した。Vitro での仮説を vivo で検証すると同時に、生体内の微小環境を加味した評価することができる。フソバクテリウムの感染の有無にかかわらず、最低 10^5 個の細胞を移植すると、約 4 週間で肝転移が得られる。肝転移巣の組織像は大腸癌オルガノイドを皮下移植した際に得られる腫瘍と類似しており、上皮マーカーである CK19 や大腸癌に特徴的な β -catenin で免疫染色され染色され、オルガノイドの肝転移であることを確認できた。転移数や体積についてフソバクテリウムの感染有無で比較したところ、感染により転移数も、体積の大きな転移巣も増えたように見えるが、個体数を増やして有意差について統計学的な検証を行う必要がある。



肉眼的所見

肝転移拡大像

大腸がん肝転移からフソバクテリウムを検出したという報告があり、肝転移巣からフソバクテリウムを検出できないか取り組んでいる。HE 染色でも顕鏡は可能だがもっとはっきりと同定するために in situ hybridization (ISH) 法も検討している。

今後、感染前後の変化、移植前後での変化について網羅的な遺伝子解析を行う予定である。

本モデルによりフソバクテリウムが大腸がんに及ぼす影響の一部を検証できたと考えている。当初、発がんメインでの研究を想定していたが、形態変化というダイナミックな事象から転移能の獲得への仮説が生まれ、フソバクテリウムが大腸がんの進展に与える影響をメインに検証することになった。結果としてフソバクテリウムが上皮間葉転換を促し、大腸がんの転移に寄与していることが不十分ながら証明することができた。フソバクテリウムは大腸癌の新たな治療ターゲットになり得る可能性が示唆された。基礎研究として裏付けの検証を継続しつつ、今後は臨床研究に広げていきたい。

一方、発がんについては、adenoma-carcinoma sequence を想定し、腺腫由来のオルガノイドにフソバクテリウムを感染させ経時的な変化を追ったが、細胞増殖能は大きな変化がなく、形態変化がもたらされたオルガノイドは少なかった。これまでの報告では、腺腫からのフソバクテリウムの検出率は低く、自身の研究室でも腺腫からフソバクテリウムの分離、培養には成功していない。がん細胞とフソバクテリウムの親和性(接着性)は指摘されているが、腺腫とフソバクテリウムの親和性はさほどないことが推測される。

参考文献

1. Moore WE, Moore LH. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61: 3202–3207.
2. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, Barnes R, Watson P, Allen-Vercoe E, Moore RA, Holt RA. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012; 22: 299–306.
3. Tsai JH, Yang J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev.* 2013; 27: 2192–2206.
4. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H. *Gastroenterology.* 2011 Nov;141(5):1762-72.
5. Rubinstein MR, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han YW. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesion. *Cell Host Microbe.* 2013; 14: 195–206.
6. Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, Clancy TE, Chung DC, Lochhead P, Hold GL, El-Omar EM, Brenner D, Fuchs CS, Meyerson M, Garrett WS. *Fusobacterium Nucleatum* Potentiates Intestinal Tumorigenesis and Modulates the Tumor-Immune Microenvironment. *Cell Host Microbe.* 2013; 14: 207–215.
7. Ito M, Kanno S, Nosho K, et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *Int J Cancer* 2015;137:1258–68.

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 松浦哲也
2. 発表標題 CONSTRUCTION OF AN ORGANONOID MODEL TO VERIFY IMPACT OF FUSOBACTERIUM NUCLEATUM ON COLORECTAL CANCER
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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
---------	---------