

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08710

研究課題名(和文) 食道癌において口腔内および食道内細菌叢がどのように影響するか？

研究課題名(英文) Influence of oral and esophageal microflora in esophageal cancer.

研究代表者

恵美 学 (Emi, Manabu)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：30464308

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)：食道切除を受けた患者305人の血液検体を用いて代表的な4種の歯周病菌に *Fusobacterium nucleatum* (F.n)を加えた5種の歯周病菌に対する血清Ig-G抗体価を測定したところ、F.nの血清抗体価のみが予後と相関することが判明した。血清IgG-F.n抗体価高値群と低値群間で臨床的特徴に有意差はなかった。多変量解析により、IgG-F.n高値は予後不良の独立因子となった (HR 1.74, 95% CI (1.17-2.59), P = 0.007)。以上より *Fusobacterium nucleatum* に対する血清IgG抗体価は予後予測に関する重要なバイオマーカーとなることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回我々は食道と解剖的に近接する口腔内細菌叢に着目し、菌叢解析をおこなってきた。口腔内細菌叢においても *Fusobacterium nucleatum* (F. nucleatum) の存在と食道癌の悪性度と相関する可能性が示され、現在も悪性度や術前治療抵抗性に関与する *F. nucleatum* 以外も含めた細菌群を解析している。同時に並行して行った歯周病菌の血清抗体価の解析にて *F. nucleatum* の血清抗体価が食道癌の術前治療効果や予後予測因子となることをつきとめることができた。この血清抗体価が食道がん治療における新たなバイオマーカーになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Serum Ig-G antibody titers against five periodontal pathogens, including four typical periodontal pathogens plus *Fusobacterium nucleatum* (F.n.), were measured using blood samples from 305 patients undergoing esophagectomy, and only serum antibody titers against F.n. were found to correlate with prognosis. There were no significant differences in clinical characteristics between the high and low serum IgG-F.n antibody titer groups. Multivariate analysis showed that high IgG-F.n titer was an independent factor for poor prognosis (HR 1.74, 95% CI (1.17-2.59), P = 0.007). These results indicate that serum IgG antibody titer against *Fusobacterium nucleatum* is an important prognostic biomarker.

研究分野：食道癌

キーワード：食道癌 口腔内細菌叢 フソバクテリウム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでの研究において腸管細菌叢が化学療法などの治療効果へ関与する経路として大きく三つの経路が判明している。細菌叢自体が腸管免疫を通じて全身免疫に関与する経路、腸内細菌が腫瘍に浸潤することで腫瘍内炎症反応を惹起し、直接腫瘍免疫を亢進する経路、腫瘍の腸内細菌が直接化学療法によるアポトーシスを誘導もしくは阻害させる経路である。口腔と食道は解剖学的に連続しており、口腔内細菌叢と食道内細菌叢の類似性が予想されるが現時点でそのような研究報告は無い。腸内細菌叢の大腸癌における腫瘍免疫や化学療法の感受性にあたえる影響が少しずつ明らかになっていることから、食道癌も同様に口腔内細菌叢から何らかの影響を受けているのではないかと考えた。調べたところ食道癌に関して口腔内細菌叢との関連は術後肺炎に与える影響以外、ほとんど研究報告を認めなかったため「食道癌における口腔内細菌叢をバイオマーカーとした疾患、治療中合併症および治療効果の予測」として当院歯学部総合診療科との共同研究として研究計画書を作成し2020年2月に当院の倫理審査委員会で承認された。当院において食道癌患者は全例、術前に歯学部総合診療科の医師による口腔ケアを施行されており、その患者を対象に現在症例集積中である。

### 2. 研究の目的

腫瘍組織において *F. nucleatum* 以外にも食道癌の予後に関連する細菌叢を同定したとしても、実臨床では腫瘍組織を採取し培養することは侵襲的であり、かつ困難である。今回我々は口腔ケアを通して蓄積したサンプルを用いて口腔内細菌叢を解析することで、食道癌にたいする悪性度の評価や術前治療の効果予測をすることができる可能性に着目した。食道癌患者から分離した細菌の性状や特性を検討した報告は国内外でもない。さらに申請者は特定の細菌の血清抗体価を測定できるシステムを構築している。これらのシステムを用いれば同定したキー細菌の有無をモニタリングすることが可能となり、口腔衛生管理継続による変化を検討することができる。食道癌の合併症や予後と口腔衛生管理の関係性を検討するために、歯周病菌の血清抗体価を用いた研究は国内外においてない。このように、食道癌の進行や治療効果、合併症の発症と細菌、細菌叢の関係を明らかにし、*F. nucleatum* 亜種の性状やがん細胞への影響を検討する研究は国内外でもなく、創造的かつ独創的である。最終的に食道癌患者におけるキー細菌を指標とする口腔衛生管理の意義を考察し、新規口腔管理システムを構築することは、医療現場に還元可能な有意義な研究であると考えられる。

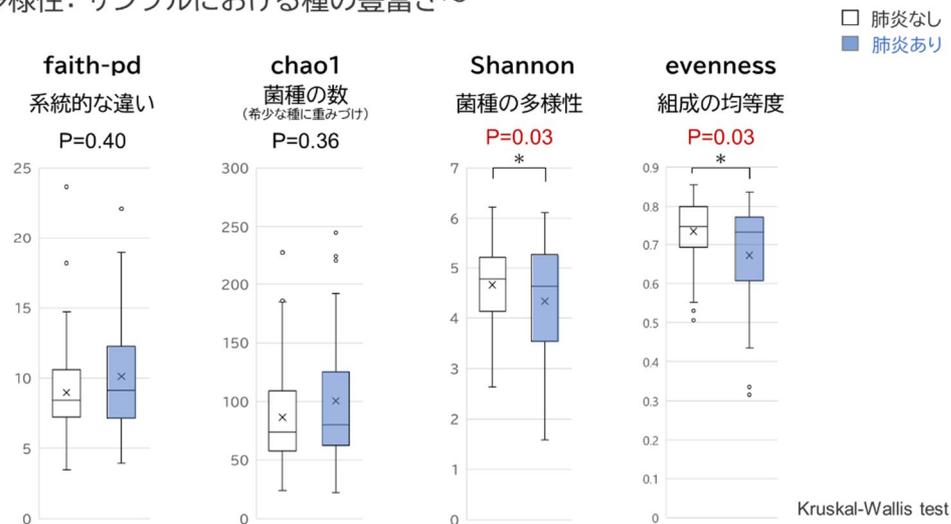
### 3. 研究の方法

2020年3月～2023年1月までの食道切除症例123例の切除検体および術前口腔からの舌苔を採取し解析を行った。さらにそれ以前の症例を含めた305例の血液検体を用いて歯周病菌の血清抗体価を測定し解析した。

#### 4. 研究成果

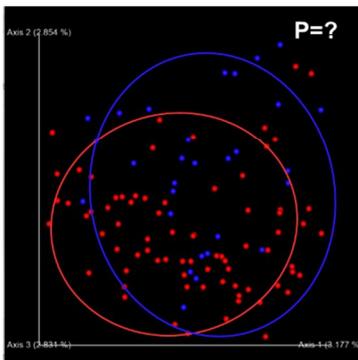
治療前に採取した舌苔から DNA 抽出し、NGS を用いた 16SrRNA シークエンスにて細菌叢を解析、術前化学療法の奏功・非奏功や合併症の有無との相関を解析した。口腔内細菌叢の解析にて術前治療の予測因子は同定できなかったが、術後肺炎の患者群においては口腔内細菌叢の および 多様性が優位に乏しい傾向を認めた。以上の結果から口腔内細菌叢の多様性が術後肺炎と相関する可能性が示唆された。

肺炎:発症群と非発症群における細菌叢解析 1  
 ~  $\alpha$  多様性: サンプルにおける種の豊富さ ~

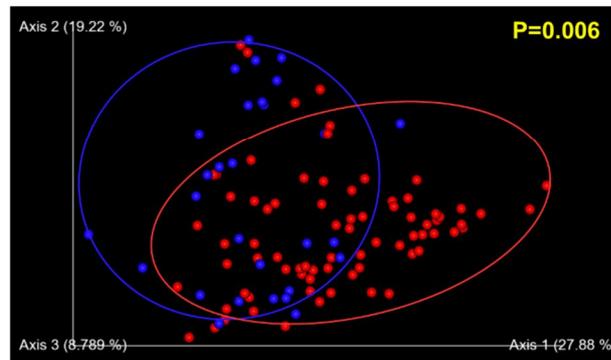


肺炎:発症群と非発症群における細菌叢解析 2  
 ~  $\beta$  多様性: 種の組成の類似度の群間解析 ~

jaccard 種の数に基づく指標



unweighted\_unifrac 系統樹で重みづけられた指標



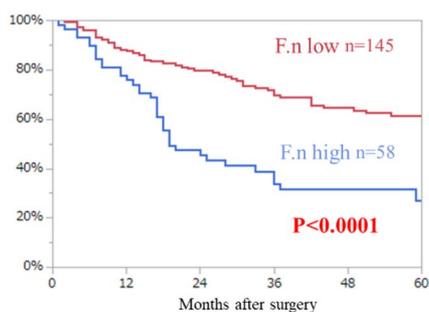
PERMANOVA analysis

食道癌患者組織から抽出した DNA において 16SrRNA 遺伝子に基づく細菌叢解析を行い、歯周病菌 Fusobacterium 属が、正常食道粘膜と比較して腫瘍組織中の存在比が高く、さらに原発腫瘍の大きさや浸潤を表す T 因子の進行によってその比率が高くなることを発見し

た

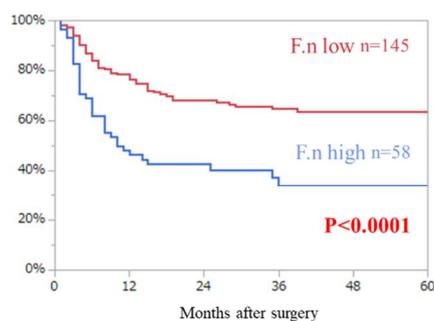
食道切除を受けた患者 305 人の血液検体を用いて代表的な 4 種の歯周病菌 ( Porphyromonas gingivalis、Aggregatibacter actinomycetemcomitans、Prevotella intermedia、Tannerella forsythia ) に Fusobacterium nucleatum (F.n)を加えた 5 種の歯周病菌に対する血清 Ig-G 抗体価を ELISA 法にて測定した。F.n の血清抗体価のみが予後と相関することが判明したため、以後 IgG-F.n 血清抗体価と臨床病理学的特徴、口腔状態および予後との関係を解析した。305 人の患者のうち、124 人(40.7 %)が IgG-F.n 血清抗体価高値であった。高値群と低値群間で臨床的特徴に有意差はなかった。高値群は全生存期間 ( OS )(  $P = 0.0011$  ) およびがん特異的生存期間 ( CSS )(  $P = 0.0081$  ) の低下と関連していた。多変量解析により、IgG-F.n 高値は CSS 不良と独立して関連していることが示された ( HR 1.74、95% CI (1.17-2.59)、 $P = 0.007$  )。さらに術前化学療法群における奏効率や予後などのサブ解析を行ったところ単変量、多変量ロジスティック回帰分析により、IgG-F.n 高値が術前化学療法の非奏功を示す独立した因子であることが示された ( OR 2.32、95% CI 1.08-4.99;  $P = 0.0311$  )。以上より Fusobacterium nucleatum に対する血清 IgG 抗体価は有意な予後予測因子であり、術前化学療法に対する非奏功を予測するバイオマーカーとしての重要な役割を示唆した。

### Over all survival



Number at risk		Years					
		0	1	2	3	4	5
IgG F.nucleatum (-)	211	188	149	113	91	78	
IgG F.nucleatum (+)	95	71	45	35	25	19	

### Reccurence free survival



Number at risk		Years					
		0	1	2	3	4	5
IgG F.nucleatum (-)	211	166	129	102	86	76	
IgG F.nucleatum (+)	95	52	36	29	23	19	

## Cox regression analyses for overall survival

Characteristic	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR(95% CI)	P	HR(95% CI)	P
Age( vs. $\leq 65$ )	1.39 (0.96-2.00)	0.08	1.35 (0.93-1.96)	0.11
<b>Male(vs.female)</b>	<b>3.51 (1.77-6.92)</b>	<b>0.0003</b>	<b>2.64 (1.20-5.82)</b>	<b>0.02</b>
Alcohol use present(vs. absent)	2.18 (1.02-4.68)	0.05	1.05 (0.45-2.44)	0.91
Tobacco use present(vs.never smoker)	2.97 (1.39-6.39)	0.005	1.83 (0.79-4.24)	0.16
Upper tumor location(vs.lower)	1.17 (0.76-1.80)	0.46		
<b>Preoperative therapy present(vs.absent)</b>	<b>2.00 (1.33-3.02)</b>	<b>0.001</b>	<b>2.08 (1.34-3.21)</b>	<b>0.001</b>
cT3,4(vs.T1,2)	3.42 (2.39-4.88)	<.0001		
cN1-3+(vs.N0)	2.83 (1.96-4.08)	<.0001		
<b>serum IgG</b>				
<b><i>F. nucleatum</i> positive(vs.negative)</b>	<b>1.75 (1.22-2.51)</b>	<b>0.003</b>	<b>2.18 (1.50-3.18)</b>	<b>&lt;0.0001</b>

続いて *F. nucleatum* 菌体における 4 亜種の血清抗体価を測定したところ、polymorphum 株のみが食道癌の生存期間に影響する因子であった。これらの結果は単なる菌種だけでなく、亜種や菌株が食道癌の進行や合併症発症のリスク因子に関与している可能性があること、さらにその性状や特性がその証明の鍵になる可能性と考えられた。*F. nucleatum* は他の菌と強く共凝集し、バイオフィルムを形成する性質が示されている。このことは食道癌の進行や合併症発症のリスク因子に *F. nucleatum* だけが関係するのではなく、*F. nucleatum* とともに形成された特異的な菌の複合体（細菌叢）が関連する可能性も考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉川徹
2. 発表標題 Fusobacterium nucleatumの血清抗体価と予後-亜種の違いによる臨床的特徴の検討
3. 学会等名 第76回日本食道学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 恵美学
2. 発表標題 食道癌手術症例において歯の欠損数は予後と相関するか
3. 学会等名 第123回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川徹
2. 発表標題 胸部食道癌における細菌叢解析
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川徹
2. 発表標題 口腔と食道癌における細菌叢の検討
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
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	西 裕美  (Nishi Yumi)  (70403558)	広島大学・病院(歯)・助教    (15401)	

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