

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08723

研究課題名（和文）大腸癌間質に存在する抗原提示細胞の機能と細胞内菌叢の解析

研究課題名（英文）Analysis of the function of antigen-presenting cells present in the stroma of colorectal cancer and the intracellular microbiome

研究代表者

西村 潤一（Nishimura, Junichi）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター（研究所）・その他部局等・消化器外科副部長

研究者番号：20379209

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：腸管マクロファージの細胞内に存在する菌叢の解析を行い炎症性腸疾患に関連する可能性のある菌種を同定することができた。大腸癌間質には様々な抗原提示細胞が存在するが、これらの細胞と腸内細菌の貪食について解析された報告はない。本研究では大腸癌間質に存在する抗原提示細胞の機能解析、細胞内細菌の同定と癌の進展や転移に関わる因子を抽出することを目的とした。今回、FACSのソート機器の制限により抗CD3、CD19、CD20、CD56抗体を用いてMACSによるnegative selectionを行った後に抗CD14抗体を用いてFACSによるソーティングを行った。DNAの抽出、解析の手法は確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌間質には様々な抗原提示細胞が存在するが、これらの細胞と腸内細菌の貪食について解析された報告はない。抗原提示細胞内に含まれる菌数が少ないために解析は困難である。今回の研究によって解析手法が確立された。この手法により、抗原提示細胞内に含まれる細菌の解析、実際の培養による菌由来の物質による抗原提示細胞の制御機構が明らかにされるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：By analyzing the bacterial flora present within the cells of intestinal macrophages, we could identify bacterial species that may be related to inflammatory bowel disease. Although various antigen-presenting cells exist in the stroma of colon cancer, there have been no reports of analysis of these cells and the phagocytosis of intestinal bacteria. In this study, the objectives were to analyze the function of antigen-presenting cells present in the stroma of colon cancer, identify intracellular bacteria, and extract factors involved in the progression and metastasis of cancer. Due to limitations of the FACS sorting machine, negative selection was performed by MACS using anti-CD3, CD19, CD20, and CD56 antibodies, followed by FACS sorting using anti-CD14 antibody. Methods for DNA extraction and analysis were established.

研究分野：消化器外科

キーワード：腸内細菌 マクロファージ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は腸管マクロファージの細胞内に存在する菌叢の解析を行い炎症性腸疾患に関連する可能性のある菌種を同定することができた。大腸癌間質には様々な抗原提示細胞が存在するが、これらの細胞と腸内細菌の貪食について解析された報告はない。

### 2. 研究の目的

これらのことから、本研究では大腸癌間質に存在する抗原提示細胞の機能解析、細胞内細菌の同定と癌の進展や転移、すなわち「癌の特性」に関わる因子を抽出することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1 大腸癌症例における抗原提示細胞の分布

当院で大腸癌に対して切除術を受ける症例を対象とする。切除した腸管の余剰検体より大腸癌部と非癌部分を採取し酵素処理により細胞を単離し FACS にて解析を行う。また、同症例の病理パラフィンブロックを用いて免疫染色により抗原提示細胞の解析を行う。

#### 2 大腸粘膜および抗原提示細胞に存在する腸内細菌の解析

切除した腸管の余剰検体より正常粘膜から粘液サンプルおよび抗原提示細胞、大腸癌部分より表面の粘液サンプル及び抗原提示細胞を採取し、DNA を精製し 16S rRNA 菌叢解析により腸内細菌を同定する。

#### 3 抗原提示細胞の分布と機能と腸内細菌の関連についての解析

個々の症例において抗原提示細胞の分布、機能、臨床病理学的因子、さらに腸内細菌のデータを統合して「癌の特性」に関連する因子を抽出する。

### 4. 研究成果

#### (1) 大腸癌症例における抗原提示細胞の分布

大腸癌手術症例の切除検体を用いて大腸癌部分と、腸管断端付近の非癌部分を全層で採取した。酵素処理により細胞を単離した。今回、FACS のソート機器の制限により抗 CD3、CD19、CD20、CD56 抗体を用いて MACS による negative selection を行った後に 7-AAD を用いて死細胞除去、抗 CD14 抗体を用いて FACS によるソーティングを行った。結果癌部分  $6 \times 10^5$  個、非癌部分  $4.5 \times 10^5$  個の細胞をソートし、CD14 陽性細胞を癌部分  $1 \times 10^5$  個、非癌部分  $5 \times 10^4$  個を採取することができた。この手法に関して合計 5 回施行し、安定して細胞を単離、分離できることを確認できた。FACS による CD14 陽性細胞の純度は 90%であった。

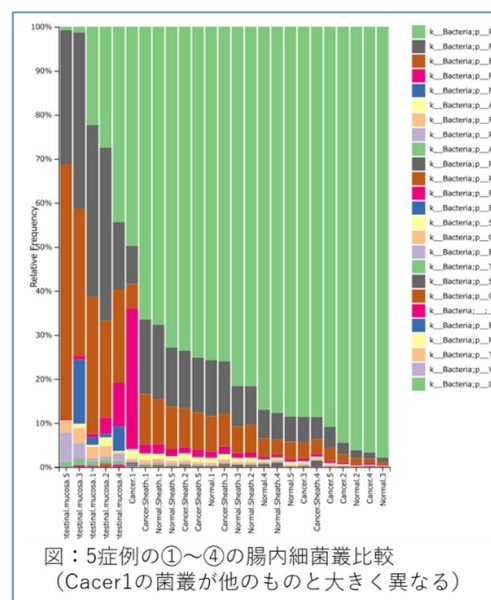
## (2) 大腸粘膜および抗原提示細胞に存在する腸内細菌の解析

採取できた細胞を酵素処理、NucleoSpin Tissue XSによりDNAを抽出し、細菌16S rRNAのDNAをPCRにより増幅し、電気泳動により目的のDNAが増幅できているのかを確認した。結果、理論的PCR産物長である471bpのバンドを確認することができなかった。ターゲットの細菌量が微量であることが原因と考えられたため、positive controlとして腸管粘膜からの細菌DNAの抽出を試行することとした。その結果、細菌量が豊富に存在する場合にも前回と同様に理論的PCR産物長である471bpのバンドを確認することができなかった。細菌DNAの安定的な抽出方法の確立を目指すために、炎症性腸疾患症例における腸管の細胞内細菌を解析した過去の手法を用いてDNAの抽出方法を検討した(Sekido Y, Sci Rep. 2020, corresponding author Nishimura J)。また、過去の他の文献も参考にし、以前と同様にDNA抽出の際にNucleoSpin Tissue XSを使用した。抽出の際に使用する酵素のproteinase KとLysozymeとAchromopeptidaseの濃度調整を行い、複数症例を費やすことによって、安定した細菌DNAの抽出し、理論的PCR産物長である471bpのバンドを確認することができるようになった。

## (3) 大腸粘膜および抗原提示細胞に存在する腸内細菌のシーケンス

5症例から、大腸癌部、非大腸癌部分、腸粘膜、 の分離に使用したシース液、 の分離に使用したシース液の各々5検体よりDNA抽出を行い、計25検体で大阪大学微生物病研究所ゲノム解析室に次世代シーケンス解析を依頼した。5症例、各5検体ともシーケンスは可能であり、シーケンスカウントは63248~982656であった。検体間での と の違いは少なかった。DNAの抽出、解析の手法は確立したが、実験の遂行に必要な助手の人員不足となり、実験の遂行が困難となった。前年度に得られた5症例からの、大腸癌部、非大腸癌部分、腸粘膜、 の分離に使用したシース液、 の分離に使用したシース液の各々5検体のシーケンス結果より、 はコンタミの成分であり、 よりを差し引いた菌叢、 よりを差し引いた菌叢、 を用いて、 、 、 の間で比較、また、5症例間での違いについて解析した結果、1症例のみが特徴的な菌叢を有していた(図)。この症例の病理学的因子、患者背景を他の4症例と比較したが、特に4症例と異なる因子の抽出には至らなかった。特に、この特徴的な1症例に関して、コンタミの可能性もあることから、4症例の菌叢に関して解析を進めることとした。現在、4症例においての共通点、 、 、 での比較によって、大腸癌間質に特徴的な菌の同定が行われると考える。この手法は今後細胞内寄生細菌の解析の一手法として応用できるものとする。

症例数を増やす予定であったが研究に携わる実験助手の人員不足の問題は解決がなく、実験が進まなくなつたため断念した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	安枝 明日香  (Yasueda Asuka)  (10745871)	東洋大学・食環境科学部・助教    (32663)	

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