

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460932

研究課題名(和文) 胃内細菌叢をターゲットとした胃癌の予防・早期発見法の開発

研究課題名(英文) Development of gastric cancer prevention and early cancer detection methods targeting changes in gastric microbiota

研究代表者

渡邊 俊雄 (WATANABE, TOSHIO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50336773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：各胃疾患に及ぼすピロリ菌の影響が極めて強いことから、これまでは細菌学的な胃内環境はピロリ菌の感染の有無にのみ焦点が当てられ論じられてきたが、本研究は胃内細菌叢に着目し検討した。特に今回はピロリ菌感染が胃内細菌叢に与える影響についてメタゲノム解析を用いて検討した。本研究で、胃内にはピロリ菌以外にも多種多様な細菌が存在することが明らかとなった。興味深いことに、ピロリ菌の感染があっても、ピロリ菌以外の菌の方が多い症例が存在することもあきらかとなった。胃の発癌を考える上でピロリ菌以外の細菌が催炎症、発癌を示す可能性が示唆され、今後追加検討が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The Aim of this study is to clarify the role of the gastric microbiota using the 16S rRNA method. In this study, we especially focused on not only H.pylori infection but also other bacterial infections. We demonstrated that there are a lot of species other than H.pylori in the gastric mucosa. Interestingly, in some samples, H.pylori were not major component in the gastric mucosa which was obtained from H.pylori infected patients. Further studies are required to clarify the relationship between gastric carcinogenesis and involvement of the other bacterial species.

研究分野：消化器内科

キーワード：胃細菌叢 胃癌 ピロリ菌

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ菌 (以下ピロリ菌) 感染は、胃粘膜に特異的に生着して慢性活動性胃炎を惹起する。胃粘膜細胞は炎症細胞が産生する活性酸素種や炎症性サイトカイン、あるいは Cag A タンパクや Vac A タンパクのようなピロリ菌自体から産生される種々の細胞傷害因子によって傷害され、上皮組織構造の破壊と再構築に伴い萎縮性変化と上皮細胞回転の亢進が誘導される。この萎縮性胃炎の進展過程で、胃粘膜細胞に種々の遺伝子変異が加わり、胃癌発生へと至るものと考えられている。この萎縮性胃炎の進展の程度には個体差があり、ピロリ菌の菌株の違い、宿主の遺伝的素因あるいは生活習慣の違いなどにより説明されているが、その要因については未だ十分には解明されていない。

最近早期胃癌の内視鏡的切除術後にピロリ菌を除菌する事で、その後の胃癌の再発が 1/3 程度に減少することが我が国における大規模臨床試験により証明されたが (Fukase K et al, Lancet 2008,)、一方で除菌後も一定の割合で 2 次胃癌が発生することも平行して明らかになった。また、高度な萎縮性胃炎を有するような症例群ではピロリ菌除菌治療は胃癌の再発を減少させなかったという報告もある (Yanaoka K et al, Int J Cancer 2009)。現在ではピロリ菌除菌療法による胃癌発生の抑制効果には限界があるとの認識が広がりつつあり、ピロリ菌存在下の発癌に加えて、除菌後発癌の病態についても注目が集まっている。ところで、除菌後の胃粘膜の特徴として好中球浸潤は早期に消退するが、マクロファージなどの単核球浸潤は長期にわたり持続することが指摘されている。したがって、胃内にはピロリ菌以外の起炎因子が持続的に存在し、ピロリ菌関連胃疾患や除菌後発癌などの各種胃病態に関与している可能性が想定される。

生体には多様な細菌が常在し、複雑な細菌叢 (フローラ、microbiota) を形成している。最近の研究の進展により腸内フローラを構成している細菌が直接腸管壁に働き、消化管の構造や機能に影響するのみならず、宿主全体の栄養状態、薬効、免疫といった生理機能や、感染、老化、発がんといった疾患に極めて大きな影響を及ぼすことが明らかとなってきた。また、消化管フローラの構成異常 (dysbiosis と呼ばれる) が種々の消化器疾患や生活習慣病、癌の発症といった様々な疾患の発症や増悪に密接に結びついていることを示すデータが報告されつつあり、消化管フローラに関する研究は大きな注目を集めつつある研究分野となっている。

21 世紀に入り、消化管フローラの解析には従来の細菌培養法による解析から分子生物学的手法を用いた培養困難な細菌を含むメタゲノム解析が行われるようになり、迅速かつ安価にフローラの解析を行うことが可能となった。例えば、大腸内細菌叢を構成している大腸内細菌の約 20~30% は培養可能であるが、残り 70~80% は培養困難な大腸内細菌であると推定されている。従来の方法では細菌叢の同定は細菌を単離し培養することによって検査していたが、多くの微生物は研究室で培養することが困難であるため、通常はこの骨の折れる作業によってほんのわずかの種類の微生物しか同定することができなかった。

ところが 20 世紀末より、この大腸内細菌叢の 70~80% を占める培養困難な大腸内細菌の解析に 16S リボゾーム (r) DNA をターゲット分子とする分子生物学的手法が導入され、大量の検体を対象に一度に迅速かつ安価に培養困難な腸管内細菌を含めた大腸内細菌叢の全貌を見ることが可能となった。しかし、本研究領域におけるメタゲノム解析の応用は始まったばかりであり、特にヒトの疾患をターゲットにした臨床研究はほとんどなさ

れていないのが現状である。

ところで、これまで胃内には、pH 1 から pH2 という強酸性状態でも生息可能なピロリ菌以外には菌はほとんど生息しないものと考えられてきた。しかしながら、最近の研究では、胃内にはピロリ菌のみならず、相当数の細菌種が生息し細菌叢を形成していることが明らかとなった。100 種類以上の細菌種が同定され、主な細菌種は *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Fimicutes*, *Actinobacteria* であったと報告されている (Bik Em et al, PNAS 2006)。現在、この胃内細菌叢と慢性萎縮性胃炎の進展や胃発癌、除菌後の胃癌の再発との関連については全く不明であるが、前述の通り除菌後も単核球浸潤などの慢性炎症が持続することなどから、ピロリ菌以外の細菌種が胃粘膜を刺激して粘膜炎症の形成、維持に関わり、胃の各病態、特に除菌後の胃癌発症などに関与している可能性が示唆される。

2 . 研究の目的

各胃疾患に及ぼすピロリ菌の影響が極めて強いことから、これまでは細菌学的な胃内環境はピロリ菌の感染の有無にのみ焦点が当てられ論じられてきたが、本研究は胃内細菌叢に着目し検討した。特に今回はピロリ菌感染が胃内細菌叢に与える影響についてメタゲノム解析を用いて検討した。

3 . 研究の方法

検体採取方法

鉗子チャンネルが内視鏡操作部の根元にあり、ここから処置具を出し入れし、粘膜組織を採取した。また、内視鏡システムの吸引ボタンを操作することで内視鏡吸引孔から消化管内容物を吸引することができるため、胃液サンプルはそこに溶液回収スピッツを接続することにより回収した。

DNA 抽出

今回は、種々の方法を試した結果、最も収率の良かった酵素法を用いた。具体的には酵素を用いた蛋白分解後に、フェノール、クロロホルム、イソアミルアルコール、引き続きポリエチレングリコールを用いる DNA 沈殿法でおこなった。

16SrDNA 解析

16S rRNA は保存性の高い領域と細菌種ごとに多様性のある領域が交互に出現する構造をしている。反応に必要な配列や、検体を区別するための配列 (MID : Multiplex Identifier) を付加したユニバーサルプライマーを 2 つの多様性領域を含むように設計した。検体由来のゲノム DNA に対して、PCR 反応を行った。この PCR 産物を PicoGreen 2 本鎖 DNA 定量アッセイキットで定量後、ロシュ 454 シークエンシングシステムでシークエンスし、各検体の配列ファイルおよびクオリティファイルを作成した。

胃細菌叢の解析

蓄積したデータをもとに解析を行った。それぞれの検体での、胃細菌叢の属 (Genus) レベルでの組成解析や腸内フローラの多様性、そして総菌数などの現在のマイクロバイオーム研究で評価されている項目を算定した。その上で、UniFrac 解析 (各菌叢の類似度の解析) を行い、部位別の特徴、消化管内容物細菌叢と消化管粘膜細菌叢との相関を確認した。同時に患者背景とそれぞれの部位の細菌叢の相関性も検討した。

4 . 研究成果

採取方法と、鋳型 DNA 抽出

ヒト胃内視鏡にて採取した生検組織、胃液検体を用いた 16S rRNA 解析を行った。ヒト胃組織は内視鏡下に約 2mm の通常生検鉗

子で採取したが、1回の生検で以降の遺伝子解析を実行できる十分量が採取できた。銚型となる DNA 抽出のステップでは、一般的に用いられる市販のキットで抽出を行うとキットに含まれる酵素由来の DNA によるコンタミネーションが発生し、結果に不具合がみられることが、今回の施行で明らかとなった。そのため、改めて最適な方法の検討を行い、最終的には方法の章に論述した酵素法を採用することになった。

検体採取部位ごとの差異

まず初めに、同一個体でのヒト胃細菌叢の検討を行い部位で差が生じるかを検討した。ヒト胃組織の採取部位としては、内視鏡にて行う萎縮性胃炎の標準評価システムであるシドニーシステムに準じて前庭部と胃体下部大彎より採取することとした。興味深いことに、同一個体から同一検査時に採取したサンプルであっても、そこに含まれる菌叢は異なっていた。菌の多様性を表す OTU の値も大部分の検体間で大きな差を認めた。また、菌の相同性を評価する Unifrac 検定を施行したところ、他の検討と同様に同一個体間であっても、細菌の相動性に大きな差を認めた。

胃細菌叢の傾向

胃細菌叢の主要構成は Firmicutes、Proteobacteria、Bacteroidetes、Actinobacteria、Fusobacteria 門であり、これらの細菌門で胃内細菌の 9 割以上を占めていた。それぞれの細菌の構成についての追加検討を行ったところ、Genus Level では Streptococcus 属が最も多くみられた。次に多数を占める細菌属は Helicobacter もしくは Prevotella であった。同一個体でのサンプルを比較したところ、やはり前述の検討と同様に大きく構成細菌そのものが異なるものが多かった。

ピロリ菌陽性と陰性患者の比較

興味深いことに臨床的にピロリ菌陽性とされている患者でもピロリ菌が検出されていないサンプルが存在した。これは、自然除菌されたもしくは、採取部位により検出できなかったことが予測され今後の検討が必要であると考えている。また、逆にピロリ菌陰性とされている症例の中でも、ピロリ菌が検出されたサンプルが存在した。これにより、臨床的にピロリ菌が陰性であると診断されていても、偽陰性となっており、実際にはピロリ菌が生息している症例がある一定数存在することが明らかとなった。次に、ピロリ菌陽性とされているサンプル内での細菌構成を検討した。サンプルによっては、95%以上ピロリ菌が存在し他の菌が存在していない症例もあれば、ピロリ菌の存在が 5%に満たない症例も存在した。そのため、胃細菌叢の検討には、単にピロリ菌の存在だけでなく、内視鏡的な萎縮性胃炎などの評価を追加する必要があると考えられた。

癌症例と非癌症例での比較

今回の検討では残念ながら明らかな傾向を指摘することはできなかった。それぞれの菌叢の比率が大事であるか、ピロリ菌以外に発がん性を持つ菌が存在するのかを明らかにするためには追加の検討が必要である。

結語

本研究で、胃内にはピロリ菌以外にも多種多様な細菌が存在することが明らかとなった。興味深いことに、ピロリ菌の感染があっても、ピロリ菌以外の菌の方が多い症例が存在することもあきらかとなった。胃の発癌を考える上でピロリ菌以外の細菌が催炎症、発癌を示す可能性が示唆され、今

後追加検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

ヒト胃マイクロバイオームの検討
H.pylori 除菌による変化の検討を含めて
灘谷 祐二、渡辺俊雄、武田翔伍、島田直、
大谷恒史、谷川徹也、永見康明、田中史生、
鎌田紀子、斯波将次、山上博一、富永和作、
藤原靖弘 53回日本消化器免疫学会総会、ホ
テルニューオータニ大阪(大阪府大阪市)、
平成28年7月14日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 俊雄 (WATANABE, Toshio)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：50336773

(2)研究分担者

藤原靖弘 (FUJIWARA, Yasuhiro)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40285292
富永和作 (TOMINAGA, Kazunari)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：80336768
谷川徹也 (TANIGAWA, Tetsuya)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：70423879