

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670194

研究課題名(和文)炎症を背景とする大腸発癌モデルにおける腸内細菌の影響

研究課題名(英文)Effect of Intestinal microbiota on inflammation induced colon cancer

研究代表者

成島 聖子(Narushima, Seiko)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：80578336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症が発癌に深く関与していることが知られているが、潰瘍性大腸炎・クローン病に代表される慢性炎症性腸疾患(IBD)においても、炎症の慢性化に伴い発癌リスクが高まることが報告されている。炎症に由来する大腸発癌(Colitis-Associated Cancer; CAC)モデルマウスとしてp53・IL-10二重欠損マウスを用い、腸内細菌の関与を検討した。p53・IL-10二重欠損マウスを無菌化し、SPF環境下のマウスと比較したところ、SPFマウスでは大腸炎、大腸腫瘍が形成されるのに対し、無菌マウスでは大腸での炎症、腫瘍が認められず、このモデルでは腸内細菌の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that chronic inflammation in the colon results in an increased risk for the development of colorectal cancer. In this study we aimed to confirm the hypothesis that intestinal microflora are required for the development of adenocarcinoma in the colon of the Interleukin 10 (IL-10) and p53 double-deficient mouse. The germ-free double deficient mice on C57BL background were produced and observed the development of colitis and colon tumor. Animals of both groups were subjected to histopathological examination. There was no development of adenocarcinoma of the colon among the germ-free mice, whereas in the mice housed under specific pathogen free conditions, high percentage of colonic inflammation and tumor development was observed. These results indicate that intestinal microflora play an important role in the development of colitis-associated cancer in this animal model, and that cancers can be prevented by controlling intestinal microflora.

研究分野：腸内細菌学

キーワード：腸内細菌 マウスモデル 大腸発癌

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症が発癌に深く関与していることが知られているが、潰瘍性大腸炎・クローン病に代表される慢性炎症性腸疾患 (IBD) においても、炎症の慢性化に伴い発癌リスクが高まることが報告されている。我々はこれまでに、129SvEv 遺伝的背景の p53・IL-10 二重欠損マウスにおいて短期間で高頻度に肉眼的に観察可能な大腸腫瘍が形成されることを確認し、ヒトの臨床像に極めて近いモデルとなりうると考えている。これまでの研究で、腸内の常在菌叢が宿主の健康、病態に大きな影響を与えることも明らかとなっているが、p53・IL-10 二重欠損マウスにおいても無菌化すると腸炎、腫瘍が見られないという知見を得ている。胆汁酸は腸内細菌の働きにより様々に変換されるが、こうして生成された二次胆汁酸の一部に、細胞毒性や発癌促進作用があることが報告されている。しかし、胆汁酸変換にかかわる菌の研究は多くなされている一方で、具体的に菌-胆汁酸-発癌の関係を明確に示した報告は限られている。

2. 研究の目的

炎症に由来する大腸発癌 (Colitis-Associated Cancer; CAC) モデルマウスとして上記 p53・IL-10 二重欠損マウスを用い、特に腸内菌による胆汁酸代謝と発癌の関わりに着目して以下の2点について研究を遂行する。

(1) ヒト腸管由来の菌の分離と、*in vitro* における各種代謝能の検討：ヒト糞便より、高度に嫌気的な条件下でのみ生育する菌を含むさまざまな菌を分離し、胆汁酸変換能をはじめとした各種代謝能を *in vitro* において評価する。

(2) ノトバイオート p53・IL-10 二重欠損マウスの作出と大腸発癌への腸内細菌の関与：二次胆汁酸生成能などに着目して選出した腸内菌 (群) を、無菌化した p53・IL-10 二重欠損マウスに投与する。作出したノトバイオートマウスについて、投与菌の定着を確認するとともに、腸炎、大腸癌の発症について観察を行い、発癌に関与する菌 (群) を特定する。本研究の成果は大腸疾患に関与する腸内常在細菌の制御を介した新しい治療、予防に有用な情報をもたらす、発癌の本質的なメカニズム解明につながる足がかりとなることが期待される。

3. 研究の方法

(1) p53・IL-10 二重欠損マウス大腸発癌における腸内菌の関与

C57BL/6 背景の p53・IL-10 二重欠損マウスを無菌化し、繁殖に必要な匹数を確保した上で、無菌のまま維持する群と通常環境下に移して飼育する群に分ける。それぞれのマウスにおける腸炎・大腸癌の発症について観察を行い、このモデルマウスにおける CAC に対する腸内菌叢の影響を確認する。

(2) ヒト腸管由来の菌の分離と、*in vitro* に

おける各種代謝能の検討

ヒト糞便より嫌気チャンバーを用いて非常に高い嫌気度を要求する EOS 細菌を含む菌の分離を行う。胆汁酸変換能に関する報告が多いクロストリジウム属の分離については、クロロホルム処理により芽胞形成菌群を選択し、その中から胆汁酸変換活性を保持する菌群の構成を繰り返し単純化することにより、菌を分離する。胆汁酸の変換能については薄層クロマトグラフィー (TLC)、液体クロマトグラフィー (HPLC)、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS) などを使用し、胆汁酸の量的及び質的な解析を行う。

(3) ノトバイオート p53・IL-10 二重欠損マウスの作出と大腸発癌に影響を及ぼす菌 (群) の特定

二次胆汁酸生成能など、大腸発癌に関与が疑われる腸内菌を無菌の p53・IL-10 二重欠損マウスに投与する。作出したノトバイオートマウスについて、菌 (群) の定着を確認しながら腸炎、大腸癌の発症について観察を行う。腸炎の評価はマウスの全身状態、下痢、肛門の汚れについて経時的に観察することで行う。大腸発癌への影響は、通常化した p53・IL-10 二重欠損マウスにおいて大腸に腫瘍が認められる期間観察を続けた後、マウスを解剖して大腸を肉眼的に観察し、更に固定して組織学的な解析を行うことで評価する。一部のマウスについては腸管組織における免疫細胞の分布、役割も検討する。

4. 研究成果

(1) C57BL 背景の p53・IL-10 二重欠損マウス大腸発癌における腸内菌の関与

p53・IL-10 二重欠損マウスを SPF 環境下で維持すると、盲腸及び大腸に杯細胞の減少、クリプトの伸長及び不規則化、炎症細胞の著名な浸潤を伴う炎症が認められ、更に腫瘍形成が観察された。これに対し無菌の二重欠損マウスでは盲腸、大腸いずれも炎症は認められず、腫瘍の発生も観察されなかった。このことから本マウスにおける大腸腫瘍発生には腸内細菌が関与していることが強く示唆された。一方、SPF、無菌どちらの環境下においても一部の個体に胸腺腫瘍が観察され、早期に死亡する個体を認めた。

(2) ヒト腸管由来の菌の分離と、*in vitro* における各種代謝能の検討

大腸ガン患者の腫瘍粘膜部より菌の分離を試みた。分離された菌の 16S rRNA のシーケンスを解析した結果、炎症誘導性や大腸癌との関わりが示唆されている、*Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium mortiferum* 及び *Leptotrichia trevisanii* などの *Fusobacterium* 属と高い相同性を示す菌をはじめとした様々な菌であることが明らかとなった。

更に、胆汁酸が腸内の偏性嫌気性菌によって細胞毒性や発癌促進作用を示すデオキシコール酸やリトコール酸などの二次胆汁酸へ

と変換されることが数多く報告されているため、ヒト便から分離された菌の胆汁酸変換能について *in vitro* でのスクリーニングを開始した。これまでに抱合型胆汁酸の脱抱合能、側鎖水酸基の脱水素反応能、脱水酸反応に寄与する菌を分離している。さらに、一次胆汁酸からマイナーな胆汁酸への変換を担う菌を引き続き分離する予定である。

(3) ノトバイオート p53・IL-10 二重欠損マウスの作出と大腸発癌に影響を及ぼす菌(群)の特定

無菌化した p53・IL-10 二重欠損マウスにヒト大腸癌粘膜より分離した *Fusobacterium* 近縁の 6 株を投与して経過観察を行った。作出したノトバイオートマウスでは盲腸・結腸内に顕著なガスの貯留を認めたが、肉眼的に明らかな腫瘍は今の所認められておらず、さらなる検討が必要と思われる。

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 5 件)

1. Atarashi K, Tanoue T, Ando M, Kamada N, Nagano Y, Narushima S, Suda W, Imaoka A, Setoyama H, Nagamori T, Ishikawa E, Shima T, Hara T, Kado S, Jinnohara T, Ohno H, Kondo T, Toyooka K, Watanabe E, Yokoyama SI, Tokoro S, Mori H, Noguchi Y, Morita H, Ivanov II, Sugiyama T, Nunez G, Camp JG, Hattori M, Umetsu Y, Honda K: Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* (査読有), 163:1-14, 2015 doi: 10.1016/j.cell.2015.08.058.
2. Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, Oboki K, Ohno T, Motomura K, Matsuda A, Yamaguchi S, Narushima S, Kajiwara N, Ikura M, Suto H, McKenzie AN, Takahashi T, Karasuyama H, Okumura K, Azuma M, Moro K, Akdis CA, Galli SJ, Koyasu S, Kubo M, Sudo K, Saito H, Matsumoto K, Nakae S: An Interleukin-33-mast cell-Interleukin-2 axis suppresses papain-induced allergic inflammation by promoting regulatory T Cell numbers. *Immunity*. (査読有), 43:175-186, 2015 doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.021.
3. Farkas AM, Panea C, Goto Y, Nakato G, Galan-Diez M, Narushima S, Honda K, Ivanov II: Induction of Th17 cells by segmented filamentous bacteria in the murine intestine. *J Immunol Methods* (査読有), 421:104-111, 2015 doi: 10.1016/j.jim.2015.03.020.
4. Shimura E, Shibui A, Narushima S,

Nambu A, Yamaguchi S, Akitsu A, Leonard WJ, Iwakura Y, Matsumoto K, Suto H, Okumura K, Sudo K, Nakae S: Potential role of myeloid cell/eosinophil-derived IL-17 in LPS-induced endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun* (査読有), 453: 1-6, 2014

[学会発表](計 5 件)

1. Atarashi K, Narushima S, Tanoue T, Nagano U, Honda K. Induction of intestinal Th1 cells by human salivary microbiota. 第 44 回日本免疫学会総会, 2015 年 11 月 20 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)
2. Tanoue T, Atarashi K, Nagano U, Watanabe E, Narushima S, Umetsu Y, Honda K. SFB-mediated Th17 cell induction is influenced by mouse genetic background. 第 44 回日本免疫学会総会, 2015 年 11 月 20 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)
3. Atarashi K, Tanoue T, Nagano U, Narushima S, Umetsu Y, Honda K. Bacterial adhesion to epithelial cells is required for Th17 induction. 第 43 回日本免疫学会総会, 2014 年 12 月 12 日、国立京都国際会館(京都府・京都)
4. Tanoue T, Atarashi K, Nagano Y, Narushima S, Umetsu Y, Honda K. Microbiota-dependent induction of IL22-producing ILC3 in the gut. 第 43 回日本免疫学会総会, 2014 年 12 月 12 日、国立京都国際会館(京都府・京都)
5. Nagano Y, Atarashi K, Tanoue T, Narushima S, Honda K. Intestinal Th17 response to pathogenic microorganisms. 第 43 回日本免疫学会総会, 2014 年 12 月 12 日、国立京都国際会館(京都府・京都)

[図書](計 1 件)

1. 成島聖子、本田賢也 他、(株)エヌ・ティー・エヌ、ヒトマイクロバイオーーム研究最前線、常在菌の解析技術から生態、医療分野、食品への応用研究まで、2016、99 - 108

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成島 聖子 (NARUSHIMA, Seiko)
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・研究員
研究者番号：80578336

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小倉嘉夫 (OGURA, Yoshio)
神戸女子大学・家政学部・教授
研究者番号：00135849

本田 賢也 (HONDA, Kenya)
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・チームリーダー
研究者番号：60334231

新 幸二 (ATARASHI, Koji)
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・客員研究員
研究者番号：60546787