

分子病理疫学を用いた大腸発癌早期における微生物群ゲノムの解析

札幌医科大学医学部 消化器・免疫・リウマチ内科学講座

研究員 五十嵐 央祥

(共同研究者)

札幌医科大学医学部 消化器・免疫・リウマチ内科学講座 教授 篠村 恭久

はじめに

近年、分子生物学の進歩により人体に存在する微生物群ゲノム (microbiome) 解析が可能になった。微生物細胞数は人体の細胞数の約10倍といわれ、個々の臓器 (消化管、皮膚等) に独自のmicrobiomeが存在している。最近の研究によりmicrobiomeは癌や感染症、代謝疾患など様々な疾患に関与していることが明らかとなってきた。大腸においてもそれは例外ではなく、炎症性腸疾患や大腸癌へのmicrobiomeの関与が報告されている。なかでもFusobacterium属は大腸癌の細胞で繁殖していることが明らかとなり、大腸発癌への関与が指摘されている。大腸癌臨床検体を用いた欧米での研究では、大腸癌症例の52%でFusobacterium属が検出され、マイクロサテライト不安定性 (MSI) などの分子異常に関連していると報告されている。しかし、日本人における大腸癌のmicrobiome解析はほとんど報告されていないのが現状である。

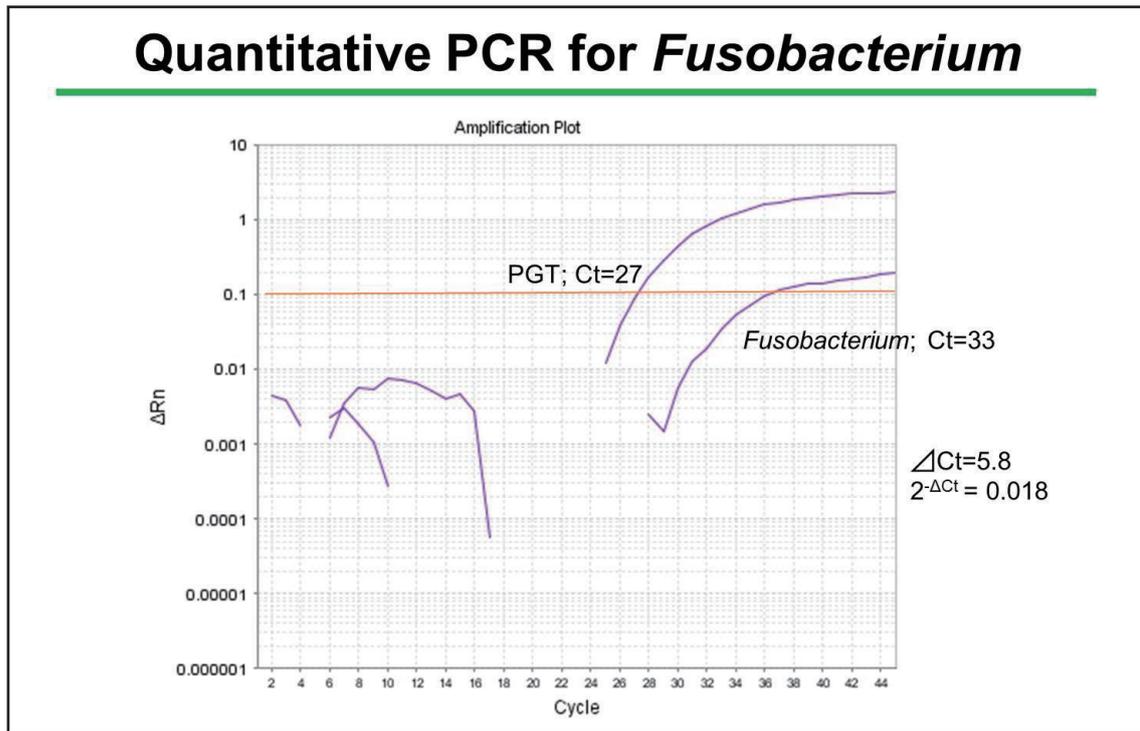
一方、我々はこれまでに大腸癌だけでなく、その前癌病変である鋸歯状病変や通常腺腫など、1,500例以上の日本人の大腸腫瘍症例のパラフィン固定標本 (FFPE) を用いて、遺伝子変異やDNAメチル化、microRNAを含むノンコーディングRNA等の網羅的な解析を行い、それらの研究成果を発表してきた^(文献1)。

今回の検討で我々は約1,000例の大腸腫瘍を対象に16S Ribosomal RNA (16S rRNA) シークエンスを行い、大腸癌やその前癌病変におけるFusobacteriumの発現を解析。さらに臨床病理学的因子や遺伝子異常との相関を検討した。

1. パラフィン固定 (FFPE) 標本を用いた大腸腫瘍のFusobacterium発現解析法の確立

本研究を成し遂げるにあたり、FFPE標本からでも凍結標本と同程度の品質で16S rRNAシークエンスによるmicrobiome解析を可能とすることが必要であった。我々と協力体制にあるダナファーマー癌研究所 (アメリカ合衆国マサチューセッツ州) とも連携し、DNA抽出方法やプライマーの選択などを検討した結果、適切なプロトコールが完成した^(文献2)。図1は16S rRNAシークエンスの結果の一例であるが、FusobacteriumのCt値が33、コントロール遺伝子であるPGT (prostaglandin transporter) のCt値が27であり、相対的なFusobacterium発現値は0.018と計算される。

(図1)



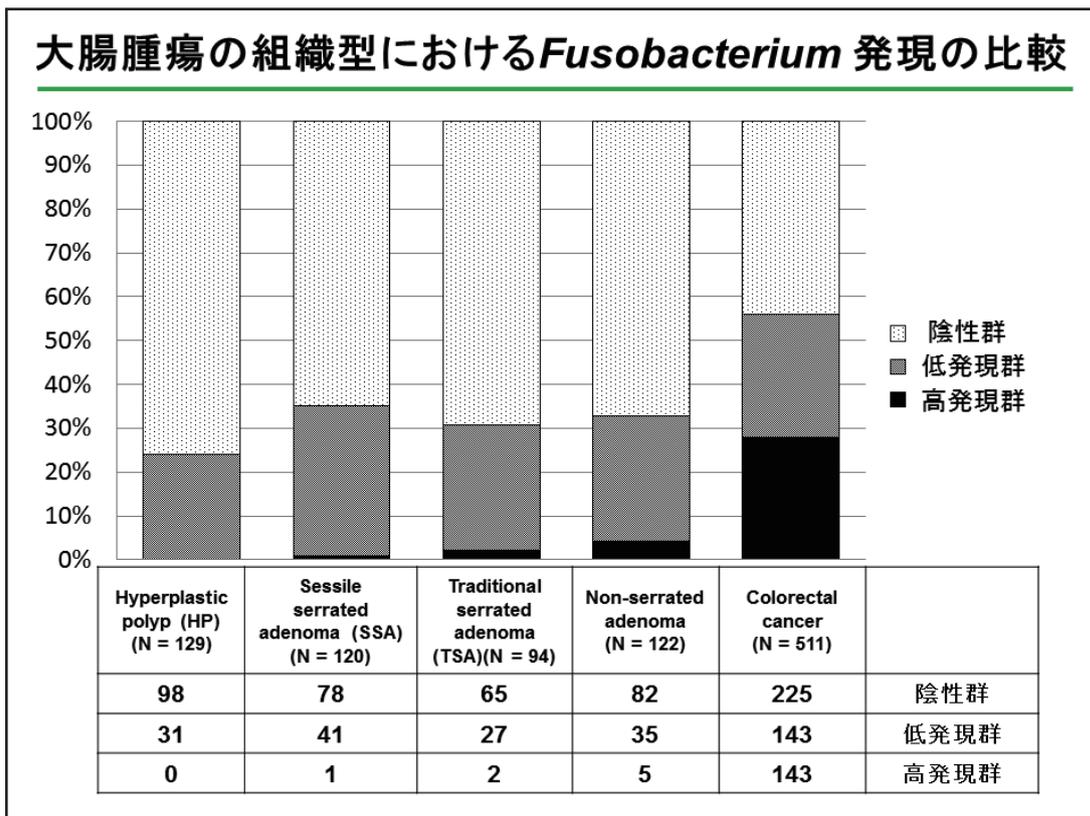
2. 16s rRNA シークエンスによる約1,000例の大腸腫瘍における *Fusobacterium* 解析

まず511例の大腸癌症例に対し16S rRNAシークエンスを行った結果、286例（56%）が *Fusobacterium*陽性、225例（44%）が陰性であった（文献2）。陽性群における *Fusobacterium* 相対発現値の中央値は0.025であり、それをカットオフ値として *Fusobacterium*陽性群を高発現群と低発現群に分け、統計学的解析に用いた。

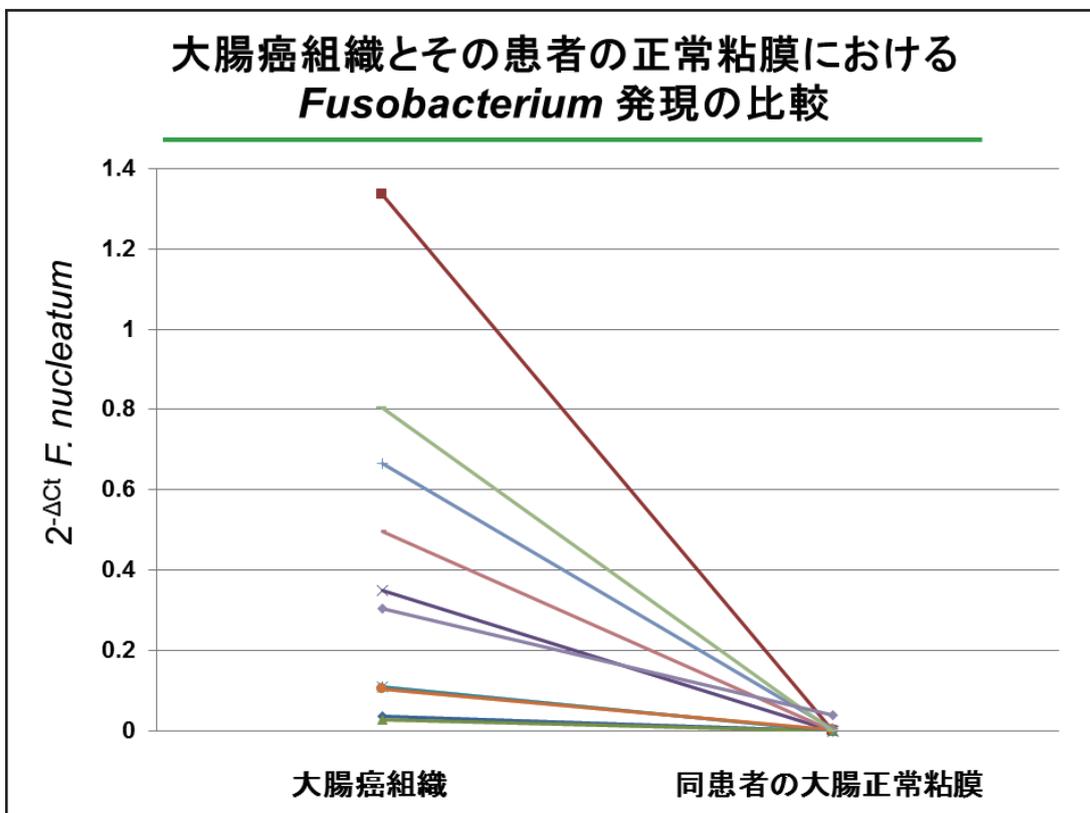
さらに我々は465例の大腸前癌病変に対しても16S rRNAシークエンスを行った。その内訳は過形成性ポリープ (hyperplastic polyp, HP) 129例、sessile serrated adenoma (SSA) 120例、traditional serrated adenoma (TSA) 94例、通常型腺腫 (非鋸歯状腺腫) 122例である。その結果、前癌病変においては約30%で *Fusobacterium*発現が認められたが、どの組織型においても大腸癌と比較すると *Fusobacterium*発現は有意に低いという結果であった。また *Fusobacterium*高発現は前癌病変においてはほとんど認められなかった (図2)。

さらに大腸癌症例における *Fusobacterium*高発現群から無作為に10症例を選択して、同一症例における大腸癌組織と癌周辺正常粘膜組織における *Fusobacterium*発現を比較したところ、すべての症例において大腸癌組織の方が高い発現を認めた (図3)。さらに大腸腫瘍の無い健常人の正常大腸粘膜に対しても *Fusobacterium*発現を解析したところ、8例のうち6例が *Fusobacterium*陰性、2例が低発現であった。正常大腸粘膜における *Fusobacterium*の発現は、大腸癌症例の方が健常症例よりも高い傾向にあったものの、統計学的有意差はなかった。

(図2)



(図3)



3. 大腸腫瘍におけるFusobacteriumの発現と臨床病理学的または分子学的因子との相関

大腸癌症例をFusobacteriumの陰性群、低発現群、高発現群の3群に分けて臨床病理学的因子や遺伝子異常における差異を統計学的に解析した。その結果、腫瘍径において高発現群で有意に大きな径であったことと、遺伝子異常においてはマイクロサテライト不安定性の大腸癌が高発現群において有意に多く認められた。さらに大腸前癌病変においては、様々な遺伝子の高メチル化を示すCpG island methylator phenotype (CIMP) 陽性の症例ではCIMP陰性例と比較してFusobacterium陽性が多く認められた (CIMP陽性:43%、CIMP陰性:27%、 $P = 0.0023$)。大腸の部位別にみると、SSAにおいては、S状結腸から盲腸 (近位結腸) に向かうにつれてFusobacterium陽性の頻度が高くなるという結果が得られた。

考 察

約1,000例の日本人の大腸腫瘍の組織検体を用いてFusobacterium発現を解析した結果、大腸癌においては56%がFusobacterium陽性でその高発現とマイクロサテライト不安定性が有意に相関するなど、欧米での報告と矛盾しない結果が得られた。さらに大腸前癌病変でのFusobacterium発現は大腸癌より低頻度であったものの、CIMP statusと相関することが明らかとなった。

大腸における炎症が発癌の危険因子であることはよく知られているが、そのメカニズムの一つとしてミスマッチ修復遺伝子などのメチル化を引き起こすことが言われている。Fusobacteriumは炎症性腸疾患や急性虫垂炎など大腸における炎症に関わることが明らかとなり、さらに最近では大腸癌でCIMP陽性とFusobacteriumの高発現が正の相関を示すことも報告されている。今回の我々の研究においても、大腸前癌病変ではCIMP陽性群で有意にFusobacterium陽性例が多く、Fusobacterium属が遺伝子のメチル化などエピジェネティックな変化に関与している可能性が考えられた。

特にserrated pathwayと呼ばれるSSAから癌化する過程においてエピジェネティックな異常が重要とされるが、そのSSAが癌化するのに重要とされる遺伝子異常は近位結腸で多く見られると報告されている。今回の研究においてSSAのFusobacterium陽性率がS状結腸から近位結腸に向かうにつれて高くなったことは、serrated pathwayによる大腸発癌とFusobacteriumの関連を示唆するものと考えられた。

今後は大腸発癌早期におけるFusobacteriumの役割を明らかにするため、さらなる症例集積と遺伝子異常の解析を進めるとともに、食習慣など生活様式に関わる因子との相関も検討を進める予定である。

要 約

1. 大腸腫瘍のFFPE標本に対し16S rRNAシーケンスを行うにあたり、適切なプロトコルを確立した。

2. 日本人の大腸癌症例におけるFusobacterium発現は56%に認められ、これは欧米人での報告とほぼ同程度であった。また大腸前癌病変や大腸正常粘膜と比較すると大腸癌組織においてFusobacterium発現は有意に高かった。
3. 日本人の大腸癌症例において、Fusobacterium高発現は大きな腫瘍径、マイクロサテライト不安定性と有意に相関し、これは欧米での報告と矛盾しない結果であった。さらに大腸前癌病変を対象とした検討ではCIMP陽性の症例でFusobacterium陽性例が多く、またSSAにおいてはS状結腸から近位結腸に向かうにつれ、その陽性例が多く認められた。

これらの研究結果より、Fusobacteriumは大腸発癌に関わっている可能性が示唆された。

文 献

1. Nosho K*, **Igarashi H***, Nojima M, et al. Association of MicroRNA-31 with BRAF mutation, Colorectal- Cancer Survival and Serrated pathway. *Carcinogenesis*. 2014;35:776-83. *These authors contributed equally
2. Ito M, Mitsuhashi K, **Igarashi H**, et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. (in submission)