

早期食道癌のESD検体を用いたゲノム・エピゲノム解析と 内視鏡洗淨廃液による分子診断の可能性

札幌医科大学医学部 消化器・免疫・リウマチ内科学講座
講師 能正 勝彦

(共同研究者)

札幌医科大学医学部 分子生物学講座 准教授 丸山 玲緒
聖マリアンナ医科大学消化器・肝臓内科 准教授 山本 博幸

はじめに

食道扁平上皮癌は喫煙や飲酒歴がその主な危険因子とされているが、欧米と比べ、わが国を含むアジア地域に頻度が高い。また食道癌の一部の症例では、それらのリスク因子がない例も存在し、異なった分子病理学的背景や環境因子をもとに発生する可能性が考えられる。近年、腸内の常在微生物群ゲノム (microbiome) 解析が可能になり、消化器発癌との関連や腫瘍内へのリンパ球浸潤等の免疫応答や生活様式等の環境因子により影響を受けることが明らかに becoming つつある。よって食道においても常在微生物種が存在し、発癌にも関与している可能性が考えられている。

食道癌の治療は内視鏡的・外科的切除だけでなく放射線・化学療法も含めた集学的治療が行われるが、その感受性はすべての食道癌で一定ではなく、その効果が乏しい症例もみられる。従って食道癌の中には異なった分子異常を呈する群が存在する可能性があるが、その原因となるゲノム、エピゲノムの異常はほとんど明らかにされていない。よってそのメカニズムを解明することは食道癌の個別化治療に繋がることが期待され、さらに特異的な分子異常を同定できれば診断や治療の標的だけでなく、リスク群の同定にもつながる可能性がある。また関連する常在微生物種が発見できれば、その発癌予防に貢献できる可能性がある。そこで食道扁平上皮癌の病態を解明する手段として、その初期病変である早期食道癌の分子異常の網羅的解析と常在微生物種の解析が重要であると考えられる。

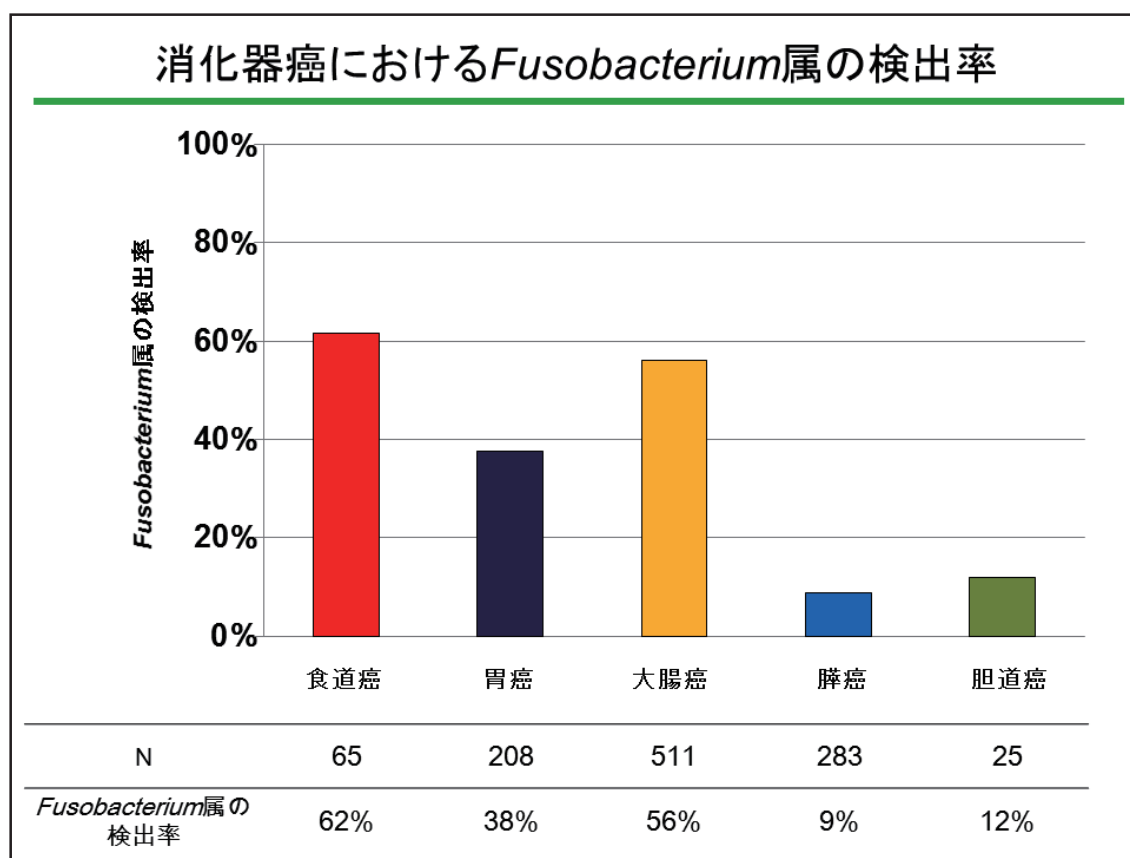
近年、我が国では食道・胃・大腸の早期癌に対する治療として内視鏡的粘膜下層剥離術 (Endoscopic Submucosal Dissection、以下ESD) が普及しつつある⁽¹⁾。ESDは病変を周囲粘膜も含めて一括切除できるため、その発生初期の病理組織学的所見だけでなく、分子異常や微生物ゲノムを解析するのに十分な組織検体を得られるというメリットがある。よって内視鏡的に完全一括切除された多症例の早期食道癌の臨床検体を用い、それらの分子異常(遺伝子変異、DNAメチル化・ヒストン修飾等のエピジェネティックな異常やmicroRNA発現等)や疾患に関連する常在微生物種を明らかにすることはその病態解明に重要と考えられる。

そこで今回、我々はESDで一括切除された多症例の早期食道癌を利用して常在微生物群ゲ

ノム解析を計画。さらに癌の分子異常としてChIP-seqやmicroRNAアレイ等に加え、同定された食道癌の常在微生物種とゲノム、エピゲノムの分子異常や生活習慣との関連を検討する。

結 果

- 1) 本研究を成し遂げるにあたり、ホルマリン固定標本からでも凍結標本と同程度の品質で16S rDNAシーケンスによるmicrobiome解析を可能とすることが必要であった。よって、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^(2, 3)。その結果として、ヒトの口腔内や腸内に常在細菌であり、大腸発癌への関与が指摘されているグラム陰性桿菌の*Fusobacterium*属が食道癌患者の正常粘膜と比較して癌組織で多く発現していることが明らかとなった。
- 2) 我々はESDで切除した早期食道癌65例の臨床検体からのDNAを抽出し、定量的PCR法を用いてその発現頻度を検討。その結果、早期食道癌の62%で*Fusobacterium*属が検出された。今回我々は食道癌以外に、胃癌、大腸癌、膵癌、胆道癌などでも癌組織における*Fusobacterium*属の発現頻度を検討したが、食道癌での発現頻度が最も高かった。



- 3) 遺伝子変異解析の結果、*KRAS*遺伝子変異は0%、*BRAF*遺伝子変異は0%、*PIK3CA*遺伝子変異は2.5%で検出されたが、いずれの変異も*Fusobacterium*属との関連性は認められなかった。
- 4) エピジェネティックな異常やマイクロサテライト不安定性 (MSI) に関しては、*MLH1*メチル化は7.5%、MSI陽性は0%であったが、*Fusobacterium*属との関連性は認められなかった。
- 5) *Fusobacterium*属が陽性の早期食道癌では有意差はないが、脈管侵襲陽性の癌が多い傾向があったが ($P = 0.08$)、喫煙や飲酒歴との関連性は認められなかった。
- 6) 上部消化管内視鏡検査時の食道洗浄廃液を用いた検討では、癌組織のDNAとRNAは抽出可能であったが、*Fusobacterium*属の検出には至らず、今後は検出プライマーの改良など更なる解析が必要と考えられた。また癌組織からのDNAとRNAを用いた非侵襲的な分子診断方法は現在、食道癌の早期発見を目指し、前向きな検討を進めているところである。

考 察

今回の検討で*Fusobacterium*属は早期食道癌（扁平上皮癌）の組織に存在することが明らかとなった。またその陽性群は、脈管侵襲陽性例が多い傾向が認められたことから生物学的悪性度に関与する可能性も示唆された。最近の進行食道癌の報告でも同様に*Fusobacterium*属陽性群は不良な予後と相関し、CCL20などのケモカインの活性化に寄与することが報告されていることから、我々の解析結果は合致している⁽⁴⁾。

このように早期食道癌を用いてゲノム解析で同定された微生物種とその分子異常、さらに環境因子との関連を検討することは、将来的に新たな予防法や診断・治療法に繋がる可能性があり、消化器癌の新たな治療戦略を世界に先駆けて報告できるものと思われる。よって、内視鏡検査時の食道洗浄廃液を用いた早期食道癌のmicrobiome解析など更なる発展が期待される。

要 約

- 1) *Fusobacterium*属は早期食道癌（扁平上皮癌）の癌組織に存在することを我々は世界に先駆けて発見した。
- 2) *Fusobacterium*属は早期食道癌の62%で検出され、その生物学的悪性度に関わっている可能性が示唆された。

文 献

- 1) Mitsuhashi K, Yamamoto I, Kurihara H, Kanno S, Ito M, Igarashi H, Ishigami K, Sukawa Y, Tachibana M, Takahashi H, Tokino T, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Yamamoto H, **Nosho K**. Analysis of the molecular features of rectal carcinoid tumors to identify new biomarkers that predict biological malignancy. *Oncotarget*, 6:22114-25, 2015.
- 2) Mima K, Sukawa Y, Nishihara R, Qian ZR, Yamauchi M, Inamura K, Kim SA, Masuda A, Nowak JA, **Nosho K**, Kostic AD, Giannakis M, Watanabe H, Bullman S, Milner DA, Harris CC, Giovannucci E, Garraway LA, Freeman GJ, Dranoff G, Chan AT, Garrett WS, Huttenhower C, Fuchs CS, Ogino S. Fusobacterium nucleatum and T-cells in colorectal carcinoma. *JAMA Oncol*, 1:653-61, 2015
- 3) Mitsuhashi K, **Nosho K**, Sukawa Y, Matsunaga Y, Ito M, Kurihara H, Kanno S, Igarashi H, Naito T, Adachi Y, Tachibana M, Tanuma T, Maguchi H, Shinohara T, Hasegawa T, Imamura M, Kimura Y, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of Fusobacterium species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis. *Oncotarget*, 6:7209-20, 2015
- 4) Yamamura K, Baba Y, Nakagawa S, Mima K, Miyake K, Nakamura K, Sawayama H, Kinoshita K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Sakamoto Y, Yamashita Y, Yoshida N, Watanabe M, Baba H. Human Microbiome Fusobacterium Nucleatum in Esophageal Cancer Tissue Is Associated with Prognosis. *Clin Cancer Res*, in press