

## 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 福岡 宏倫

横浜市立大学大学院医学研究科 消化器・腫瘍外科学

### 審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科 肝胆膵消化器病学 主任教授 中島 淳

副査 横浜市立大学附属病院 消化器・一般外科 准教授 利野 靖

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 免疫学 准教授 西山 晃

博士の学位論文審査結果の要旨

## Elucidating colorectal cancer-associated bacteria through profiling of minimally perturbed tissue-associated microbiota

(組織関連微生物叢のプロファイリングによる大腸癌関連細菌の解明)

### 【背景・目的】

大腸癌（CRC）は世界的に最も多い癌の一つである。日本では、CRCによる年間死亡者数は着実に増加しており、2016年には50,000人を超えた。大腸がんは多因子性の病因を持ち、一般的な危険因子としては、遺伝子変異、不健康な食事や生活習慣、炎症プロセスの乱れなどが挙げられる。さらに、いくつかの細菌が大腸腫瘍形成に関与しており、その発癌作用の根底にあるメカニズムが解明されつつある。CRC患者の組織関連微生物叢に関する現在の研究では、一般的にサンプリング前に腸管を準備する。しかし、腸管前処置は腸内細菌叢を変化させる可能性があり、腸管前処置によるマイクロバイオームの多様性と組成の短期的な変化は、消化管微生物叢研究において交絡効果をもたらすことが示されている（Harrell L et al.）そこで我々は、術前腸管前処置を行わずに大腸切除を受けた患者の腫瘍および隣接する非癌性大腸組織の粘膜微生物叢をプロファイリングすることにより、CRC関連細菌を同定する可能性を評価した。

### 【方法】

2019年10月から2021年3月の間に横浜市立大学附属病院でCRCと診断され大腸切除術を受けた患者を対象とした。Enhanced Recovery After Surgery プロトコールに従って手術を受けた11名の患者から組織サンプルを採取した。組織は無菌条件下で取り扱い、がん組織の破壊や糞便物質の混入を避けた。サンプルは採取後即座に液体窒素で凍結し、分析のために-80度下に保存した。DNA抽出のために濃縮培養を用いて、16S rRNA 遺伝子のV4超可変領域のアンプリコンシークエンシングとショットガンメタゲノムシークエンシングを行った。DNA抽出には、組織粉碎、

フェノール-クロロホルムベースの抽出、精製が含まれた (Tourlousse et al.) アンプリコン配列は処理され、メタゲノミックデータは前処理、ヒト DNA 除去、アセンブリー、ビニング、アノテーションを受けた。ASV (amplicon sequence variants) と metagenome-assembled genomes (MAG) は、MarkerMAG を用いて連結した。その後、R の様々なバイオインフォマティックツールを用いて、多様性、組成、存在量の差異についてデータを解析した。存在量の差異解析は、腫瘍内サンプルと腫瘍外サンプルとの間で有意な差異を示す ASV を同定するために行った。本研究は、CRC 組織に関連する微生物叢に関する洞察と、培養ベースおよび分子学的手法を用いたゲノムの特徴付けを提供し、CRC に関連する潜在的な微生物マーカーに光を当てたものである。本試験の実施計画書は、横浜市立大学倫理委員会 (B190600051、F220600030) により承認され、大学病院医療情報ネットワーク (UMIN) に UMIN000038703、Japan Primary Registry Network (jRCT) に jRCT1030220239 として登録された。

### 【結果】

本研究では、術前腸管洗浄液を行わずに大腸切除術を受けた 11 例の大腸組織を解析した。組織サンプルは腫瘍および腫瘍部位から様々な距離の隣接非腫瘍部位から採取し、合計 98 サンプルを得た。16S rRNA 遺伝子の V4 領域の塩基配列が決定され、*Firmicutes*、*Bacteroidota*、*Proteobacteria*、および *Actinobacteriota* が優勢な微生物叢組成が明らかになった。 $\alpha$  多様性は患者間で異なるが、微生物叢の腫瘍の有無では多様性と有意な関連を示さなかった。被験者をマッチさせた腫瘍上/腫瘍外の微生物叢解析では、患者間で様々な非類似性が示された。一部の患者では、腫瘍内微生物叢が腫瘍外微生物叢と比較して特徴的であった。特に、*Leptotrichia*、*Streptococcus*、*Fusobacterium* のような属が腫瘍サンプルで濃縮された。腫瘍部位における特定の ASV の局所的な濃縮が観察され、腫瘍内における明確な微生物群集が強調された。さらに、全患者の腫瘍内サンプルで濃縮された ASV に焦点を当てた解析を行った結果、濃縮された ASV の中に *Fusobacterium*、*Treponema*、*Bacteroides* のような分類群があることが明らかになった。この研究により、これまで培養されていなかった種が同定され、腫瘍部位近傍での濃縮/欠乏パターンが局在化し、特定の微生物分類群の部位特異的性質が強調された。ショットガンメタゲノミクスとアSEMBルされたコンティグのビニングにより、115 の中〜高品質の MAG が得られた。ASV と MAG をリンクさせると、*Gemella morbillorum* や *Peptostreptococcus stomatis*、"*Fusobacterium\_A ulcerans\_A*" など、腫瘍部位に濃縮されたゲノムが同定された。いくつかの MAG は未培養微生物に特有の分類群であり、大腸がんにおける潜在的な役割を示していた。

### 【考察】

腫瘍内微生物叢と腫瘍外微生物叢の非類似性は患者によって大きく異なり、腫瘍

関連微生物叢の違いによって患者を分類できる可能性がある。*Fusobacterium*、*Peptostreptococcus stomatis*、*Parvimonas micra* など、過去に CRC との関連が報告されている特定の細菌の存在量の増加が腫瘍組織で検出され、CRC 発症におけるそれらの関連と一致した。しかしながら、これらの細菌の正確な役割（発癌の誘因因子としてか、腫瘍微小環境における日和見細菌としてか）は不明なままである。注目すべきことに、これらの細菌の濃縮は腫瘍に限局しており、腫瘍の端から数 cm の範囲では減少していた。さらに、*Fusobacterium nucleatum* 以外の *Fusobacterium* の系統型、特に "*Fusobacterium\_A ulcerans\_A*" は腫瘍部位で顕著な濃縮を示し、CRC の病原性に関連する FadA アドヘシン（接着剤）をコードしている可能性があった（Rubinstein et al.）さらに、腫瘍組織上の濃縮培養から回収された複数の菌種の中には、*Erysipelatoclostridium ramosum*、*Clostridium\_Q symbiosum*、および分類されていない *Collinsella* などのいくつかの MAG が複数の患者から検出され、CRC におけるこれらの菌種の役割の可能性を示唆した。

審査にあたり、以上の論文内容の説明がなされた後、以下の質疑応答が行われた。

まず、西山副査より次の質問がなされた。

- 1) 本研究では、11人のうち、癌部と非癌部の動態が異なる3症例に絞って詳細に検討されているが、その他の8症例はできていない。今後それらの中からどのように共通性を見出していくと良いと考えますか。
- 2) 大腸癌部分と周辺の正常粘膜部分を比較していますが、途中で大腸癌部分と糞便の腸内細菌構成の違いを示していました。全症例で糞便を解析対象にしなかったのですか。それとも糞便を解析できなかった理由があるのでしょうか。
- 3) 患者間の腸内細菌叢の構成のばらつきはどのように評価すべきなのでしょうか。
- 4) 手術検体はなかなか採取できないと思われそうですが、今後どのように集積していくことがいいのでしょうか。
- 5) ロングリードシーケンスを用いることで、一つ一つの種類のゲノム情報を得られることは考えられますか。

これらの質問に対して以下のように回答が行われた。

- 1) 本研究の結果のように、菌種が異なっても、大腸癌の増悪に関連するタンパク質をコードするゲノムが共通している場合がある。そのため、すべての菌種のゲノムを調べていくことで共通性が見えてくる可能性があると考えます。しかしながら、データ量が膨大になることとコストが大きくなってしまふことがハードルになると考えます。
- 2) 手術前の入院二日間で糞便の提供を依頼していたのですが、高齢者から糞便を採取するのが難しかった。一般的な便潜血検査と同様の手順であるにも関わらず採取できない症例が半分以上であった。この辺りは、手術前1週間くらいの期間を広げることと、自宅でも採取・保管できるようなシステム作りが大事だと考えます。
- 3) 少なくとも千人から1万人くらいの症例を集積しないと本質は見えてこない可能性があります。手術検体では集積するのがなかなか難しい面がありますが、多施設研究などで地道に症例を蓄積していかなければならないと考えます。
- 4) 地道に症例を集積する必要があることと、糞便や口腔粘膜のように比較的採取しやすいサンプルと手術検体の関係性を調べて明らかにすることで、手術検体ではない採取サンプルで手術検体内の情報が得られるようになると良いと考えます。
- 5) ご指摘の通り、得られる可能性があります。現在ロングリードシーケンスの技術も習得中で、2本論文文化しております。

次に、利野副査より次の質問がなされた。

- 1) 手術時の麻酔直前の抗菌薬はどのように考えていますでしょうか。
- 2) アルコールは何か関係があるのでしょうか。
- 3) 既報の腸管洗浄液投与前後の腸内細菌叢構成の違いを示していたが、本研究の手法と異なる点がありますか。
- 4) 癌で濃縮している *Fusobacterium* は悪さをしているのでしょうか。

これらの質問に対して以下のように回答が行われた。

- 1) ご指摘のとおり、全症例点滴による予防的抗菌薬が投与されます。そのため、本論文にも記入しております。
- 2) アルコール・飲酒については、現時点では検討できておりません。
- 3) 既報に示した下部消化管内視鏡による腸管洗浄液投与前後の比較は、同部位の S 状結腸粘膜の生検を行っているため、本研究と同様と考えております。
- 4) 濃縮しているから悪さをしているのかはまだ断定できません。大腸癌成長抑制に働いている可能性もあります。少なくとも大腸癌に何らかの関わりがありそうだ、ということまでの事実が本研究の結果です。因果関係を求める実験系を計画していますので、進めていきたいと思っております。

次に、中島主査より以下の質問がなされた。

- 1) 本研究では *Fusobacterium nucleatum* が出てこなかったのでしょうか。
- 2) 培養を入れた実験系が誤りの可能性がありますか。 *Fusobacterium nucleatum* は培養もなかなか難しいので。

これらの質問に対して以下のように回答が行われた。

- 1) 出てきませんでした。理由としては 2 つ考えられます。1 つは、 *Fusobacterium nucleatum* の保有率は既報によってはさまざまであり、偶然本研究には存在しなかった可能性です。もう 1 つは、培養を介しているため、培養できていない可能性です。培養に関しては、当初本研究では粘膜組織を採取していたが、メタゲノム解析を行うとヒトゲノムが大半を占めてしまい、癌部に濃縮する菌種を同定することが困難となったため、培養して培養できたものをメタゲノム解析した、ということになります。
- 2) ご指摘のとおり、その可能性があります。そのため、現在は、メタゲノム解析用に粘膜採取ではないサンプルも並行して採取しております。

以上のように各質問に対して回答を行った。

審査員による協議の結果、本研究は博士（医学）の学位授与に値すると判断された。