

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893081

研究課題名(和文) 肝発癌を促進する腸内細菌叢の同定

研究課題名(英文) Impact of gut microbiota on promotion of liver carcinogenesis

研究代表者

飯田 宗穂 (Iida, Noriho)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40705604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：C型慢性肝炎由来肝細胞癌患者(HCC)8名、非担癌C型慢性肝炎患者(CLD)8名、健常者(HD)6名の便中DNAのシーケンシングを行った。HD 5人とCLD 3人が近くクラスタリングされ、HCC8人を含む残りが近くクラスタリングされ、肝癌患者は健常者と異なる細菌叢を持つことが示唆された。肝癌患者便を移植したマウスでは肝発癌が67%であったのに対し、健常者便移植マウスでの肝発癌率は0%であった。

研究成果の概要(英文)：Sequencing with fecal DNA harvested from hepatocellular carcinoma (HCC) patients, chronic liver disease (CLD) patients and healthy donors (HD) reveals that the microbiota of the HCC patients was differently clustered from HD microbiota. Liver carcinogenesis was observed in 67 % of mice transplanted with feces of HCC patients, but no carcinogenesis was seen in the mice transplanted with HD feces.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝癌

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌はC型肝炎ウイルス(HCV)やB型肝炎ウイルス(HBV)を原因とした慢性肝炎と肝硬変を背景に発生することが一般によく知られている。近年は非アルコール性脂肪肝炎を背景とした肝発癌も知られている。どの場合も、炎症の持続による線維化と発癌は相関し、ウイルスの消失や脂肪肝炎の軽快に伴い発癌率は低下する。しかし、線維化の弱い例でも発癌する症例や、抗ウイルス療法でウイルスが消失した5年以上後にも発癌する例が報告されており、ウイルスや脂肪化による肝炎と線維化だけでは説明できない発癌促進因子が存在することが示唆されている。

腸内細菌が新たな肝発癌促進因子であることが動物モデルで提案されている。例えば、ジエチルニトロサミンと四塩化炭素による肝発癌モデルでは、無菌マウスにおいて発生する肝癌の数が通常管理されたコントロールマウスに比べ減少することが報告されている。抗生物質4剤を飲用させ腸内細菌叢を100分の1以下に減量させたマウスでは無菌マウスと同様に肝発癌頻度の減少と癌の大きさの縮小化が報告されている一方、ペニシリン1剤を内服させ腸内細菌叢の内容が変化したラットでは肝発癌が促進した。これらの結果は腸内細菌叢の中の一部の特定の細菌グループが肝発癌を促進している可能性を示唆している。しかし、具体的にどのような細菌グループが肝発癌を促進するのかについては明らかになっていない。

ヘリコバクター・ピロリが胃癌の発生を促進するのはよく知られており、臨床の現場においてもピロリ菌の除菌によって胃発癌が減少することが多数報告されている。腸内細菌が関与していると考えられる大腸発癌や肝発癌において、このヘリコバクター・ピロリのような発癌を促進する

菌が現在まで特定されていないのは、腸内細菌のほとんどが培養できないという技術的な問題による部分も大きかったと思われる。次世代シーケンサーの出現によって、培養不可能な細菌のDNAによる網羅的なプロファイリングが可能になった。例えば、肝硬変患者36例における腸内細菌DNA (microbiome)のシーケンシングによって、肝硬変患者は健常者と比較して異なる腸内細菌叢を持っており、149のoperational taxonomic units (OTU)が肝硬変特有の細菌分類と結論されている。しかしながら、これらの149OTUの細菌が肝発癌に及ぼす影響までは知られておらず、また肝癌患者において同様の腸内microbiome解析の報告も無い。

## 2. 研究の目的

肝発癌を促進する腸内細菌叢の特徴を推定するために次の2点を具体的な目的とする。

- (1) 肝癌患者の腸内細菌叢のプロファイルを調べる
- (2) 肝癌患者由来の便が対照者の便に比べて発癌性を持つことを、ヒト便を移植したヒト化マウスモデルにて実証する。

## 3. 研究の方法

(1) 肝細胞癌患者8名、非担癌C型慢性肝炎患者8名、健常者6名の便からDNAを抽出し、イルミナ社のMiseqを用いて全ゲノムショットガンシーケンシングを行った。QCやヒトゲノムの除去を経て得られたリードから、細菌叢の組成を同定し、クラスタリング、多様性の計算を行なった。肝細胞癌に特徴的な腸内細菌を線形判別分析にて決定した。

(2) 癌患者便が発癌を促進するかを調べるために、肝癌患者に特異的な腸内細菌叢のプロファイルを同定した後に、特に相関の高い腸内細菌の候補を絞りそれらの細菌を高い割合で含む癌患者の便を選別する。-80に保存された便でも、マウスに移植できることは過去に報告されており同方法でヒト便

を移植されたヒト化マウスを作成する。具体的には当科で保有する無菌アイソレータ (ICM社製)内に搬入された無菌 C57BL6 マウス (Taconic, 日本 CLEA 仲介)を自家繁殖に用いる。生まれた無菌マウスにもう一つの無菌アイソレータ内で便を移植する。肝癌患者 15 例の便から 30 匹のヒト化マウスを作成し、コントロール慢性肝炎患者 10 例の便から 20 匹のヒト化マウスを作成する。移植 7 日後に病原体フリー (S P F) の施設にマウスを移動させ、肝発癌実験を開始する。S P F 施設では、他のマウスと飲用水、床敷き、試料、ケージを区別し細菌の混入が起こらないよう管理する。肝発癌は過去の報告通り、ジエチルニトロサミン (DEN; Sigma) 25mg/kg を 1 回、その後四塩化炭素 (0.5ml/kg) を 22 週腹腔注射する。

#### 4. 研究成果

Average linkage clustering では HD 5 人と CLD 3 人が近くクラスタリングされ、HCC8 人を含む残りが近くクラスタリングされた。細菌種に対する多様性の指標である Shannon-Wiener Index の計算では HD 2.18, CLD 2.12, HCC 2.07 と有意差を認めなかった。線形判別分析では HD 群との比較でも CLD 群との比較でも、HCC 群に有意に異なる細菌がみられた ( $P < 0.05$ )。遺伝子解析では炭水化物代謝の遺伝子に差を認める傾向にあった。

また、ヒト便移植マウスにおける発癌実験においては、肝細胞癌患者便移植マウスでの発癌率が 67% (8/12)、非担癌 C 型慢性肝炎患者便移植マウスでの発癌率が 67% (8/12)、健康者便移植マウスでの発癌率が 0% (0/6) であった。

#### 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 5 件)

- (1) Noriho Iida 「The role of gut commensal bacteria in anti-tumor innate immune effects of chemotherapy」第 43 回日本免疫学会 平成 26 年 12 月 10, 11, 12 日 国立京都国際会館 (京都府京都

市)

- (2) Noriho Iida. 「The role of commensal bacteria in inflammatory tumor microenvironment」第 73 回日本癌学会 International Session, 平成 26 年 9 月 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

- (3) Noriho Iida. 「Gut microbiota control responses of innate immune cells to anti-cancer therapies」第 22 回国際マクロファージ分子生物シンポジウム、平成 26 年 6 月 2, 3 日、神戸商工会議所 (兵庫県神戸市)

- (4) 飯田 宗穂、水腰 英四郎、金子 周一。「肝臓化学療法における腸内細菌叢と自然免疫の役割の検討」第 50 回日本肝臓学会総会、平成 26 年 5 月 29, 30 日、ホテルニューオータニ (東京都)

- (5) 飯田 宗穂、水腰 英四郎、金子 周一。「肝細胞癌患者の腸内細菌叢の特徴の検討」第 23 回消化器関連学会週間 平成 27 年 10 月予定 (発表確定) 品川プリンスホテル (東京都)

[図書] (計 0 件)

[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：  
出願年月日：  
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

飯田 宗穂 (IIDA, Noriho)  
金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40705604

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：