

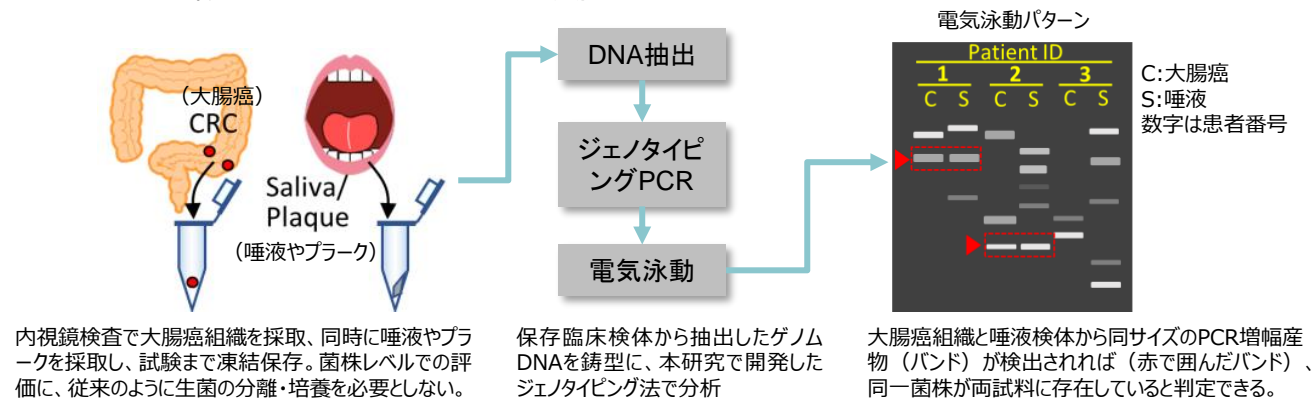
大腸癌組織や唾液検体中のフソバクテリウム・ヌクレアタム(Fn)を 菌株レベルで検出する手法を開発 大腸癌に口腔内と同一菌株由来のFnが侵入していることを確認

協同乳業株式会社(本社:東京・中央区/社長:宮崎 幹生)の松本光晴主幹研究員らは、横浜市立大学肝胆膵消化器病学の日暮琢磨講師、中島淳教授、理化学研究所の服部正平客員主管研究員、須田互チームリーダーらとの共同研究で、大腸癌の増悪化に関与している*Fusobacterium nucleatum*(フソバクテリウム・ヌクレアタム、以下*F. nucleatum*)に関する菌株(※1)レベルでの研究を大幅に進展させました。具体的には、同一大腸癌患者の大腸癌組織および唾液から分離した*F. nucleatum*が同一菌株に由来することを全ゲノム解析で確認しました。さらに、生きた菌を分離・培養しなくても、凍結保管していた大腸癌組織や唾液検体中に存在する*F. nucleatum*を菌株レベルで検出する新たな手法(ジェノタイピング法)を開発しました。この研究成果は、American Society for Microbiology(アメリカ微生物学会)の発行する学術誌「Microbiology Spectrum」に10月11日にオンライン公開されました。

《本研究のポイント》

- 当研究チームは先の研究で、口腔内の*F. nucleatum*と同一菌株が大腸癌組織から検出されることを発見し、口腔内*F. nucleatum*が大腸癌の増悪化に関与している可能性を強く示唆すると共に、大腸癌と*F. nucleatum*の研究は菌株レベルで実施することの重要性を提唱しました(Gut. 68:1335-1337, 2019)。しかしながら、そのためには大腸癌患者の大腸癌組織や唾液から生きた*F. nucleatum*を分離・培養して各分離株のゲノムを個別に解析する必要があり、熟練した分離・培養スキルに加え、時間およびコスト面でも課題がありました。
- 本研究では、*F. nucleatum*を含む約半数の細菌が保有する免疫機構であるCRISPR-Casシステム(※2)に着目し、過去に感染を受けたファージ(※3)の遺伝子断片が保存されている遺伝子領域(CRISPR)を標的に、菌株毎の感染歴の違いをPCRで増幅されるDNA断片長の違いとして検出することで、菌株レベルで識別する方法(ジェノタイピング法)を確立しました。
- これにより、生菌の分離や、分離した菌株の全ゲノム解析を行わなくても、凍結保存された唾液や大腸癌検体を用いて、検体中の*F. nucleatum*菌株をPCRで簡単かつ迅速に確度高く同定することが可能になりました。
- この方法で大腸癌患者の唾液および大腸癌組織から同一菌株と判定されたペア(5ペア)をそれぞれ全ゲノム解析した結果、これらの菌株は同一菌株由来であることが確認できました。すなわち、大腸癌患者の口腔内と癌組織に同一菌株由来の*F. nucleatum*が存在することを証明しました。これは、口腔内の一部の*F. nucleatum*が大腸癌増悪化に関与していることを見出した世界初の発見となります。
- 本研究成果は、大腸癌の予防や再発防止などの研究に飛躍的な進歩をもたらすことが期待されます。

開発した技術の概要 (論文の一部を説明用に改変)



《原著論文情報》

著者: Yumi Shimomura, Yutaka Sugi, Aiko Kume, Wataru Tanaka, Tsutomu Yoshihara, Tetsuya Matsuura, Yasuhiko Komiya, Yusuke Ogata, Wataru Suda, Masahira Hattori, Takuma Higurashi, Atsushi Nakajima, Mitsuharu Matsumoto

論文タイトル: Strain-level detection of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer specimens by targeting the CRISPR-Cas region.

雑誌名: Microbiology Spectrum

DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.05123-22>

《研究概要》

■背景

「がんの統計2023」(公益財団法人がん研究振興財団)によると、大腸癌の死亡数は男女ともに増加傾向が続いており、2022年の大腸癌死亡数予測は女性で1位、男性で2位と高く、喫緊の対策が必要となっています。*F. nucleatum*は、歯周病の原因菌の一つとされるヒトの口腔内常在菌として知られていましたが、この10年間で大腸癌組織から高頻度で検出され、大腸癌の増悪化に関与することが明らかになってきました。当研究グループは先の研究で、大腸癌組織と唾液から*F. nucleatum*を分離し、AP-PCR(※4)で解析しました。大腸癌に*F. nucleatum*を保有している患者の75%で、大腸癌組織と口腔内に同一菌株の*F. nucleatum*が存在することを強く示唆するデータを得て、口腔内*F. nucleatum*が大腸癌の増悪化に関連する可能性と、この関連性の解明には種レベルより細かい菌株レベルでの解析が重要であることを報告しました(Gut 68:1335-1337, 2019)。しかしながら、菌株レベルの研究には、*F. nucleatum*を分離・培養して各分離株のゲノムを個別に解析する必要があり、熟練した分離・培養スキルに加え、時間およびコスト面の問題もあることから、汎用するには多くの課題がありました。本研究では、これらの課題を解決し、正確かつ簡便に大腸癌患者の検体から*F. nucleatum*を菌株レベルで識別する方法の開発を目指しました。具体的には、*F. nucleatum*を含む約半数の細菌が保有する免疫機構であるCRISPR-Casシステムに着目し、過去に感染を受けたファージの遺伝子断片が保存されている遺伝子領域を標的としてPCR増幅し、菌株毎の感染歴の違いを増幅されたDNA断片長の違いとして検出することで、菌株を識別する方法(ジェノタイプング法)の確立を目指しました。

■結果

本研究では、*F. nucleatum*が保有するCRISPR-Casシステムの探索から始めました。データベースに登録されていた*F. nucleatum*の全ゲノム情報および我々が分離した菌株の合計26菌株を用いて調べた結果、4タイプのCRISPR-Casシステムを保有していることがわかりました(タイプI-B1、タイプI-B2、タイプII-A、タイプIII-A)。

次に、CRISPR-Casシステムの中で、過去に感染を受けたファージのDNA等の断片配列が挿入されているCRISPRと呼ばれる領域[繰り返し配列(リピート配列)とその間に挿入されている感染ファージのDNA断片(スペーサー配列)の繰り返し領域(図1)]を増幅するプライマーおよびPCR条件を4タイプそれぞれに構築しました(*F. nucleatum*菌株識別ジェノタイプング法)。

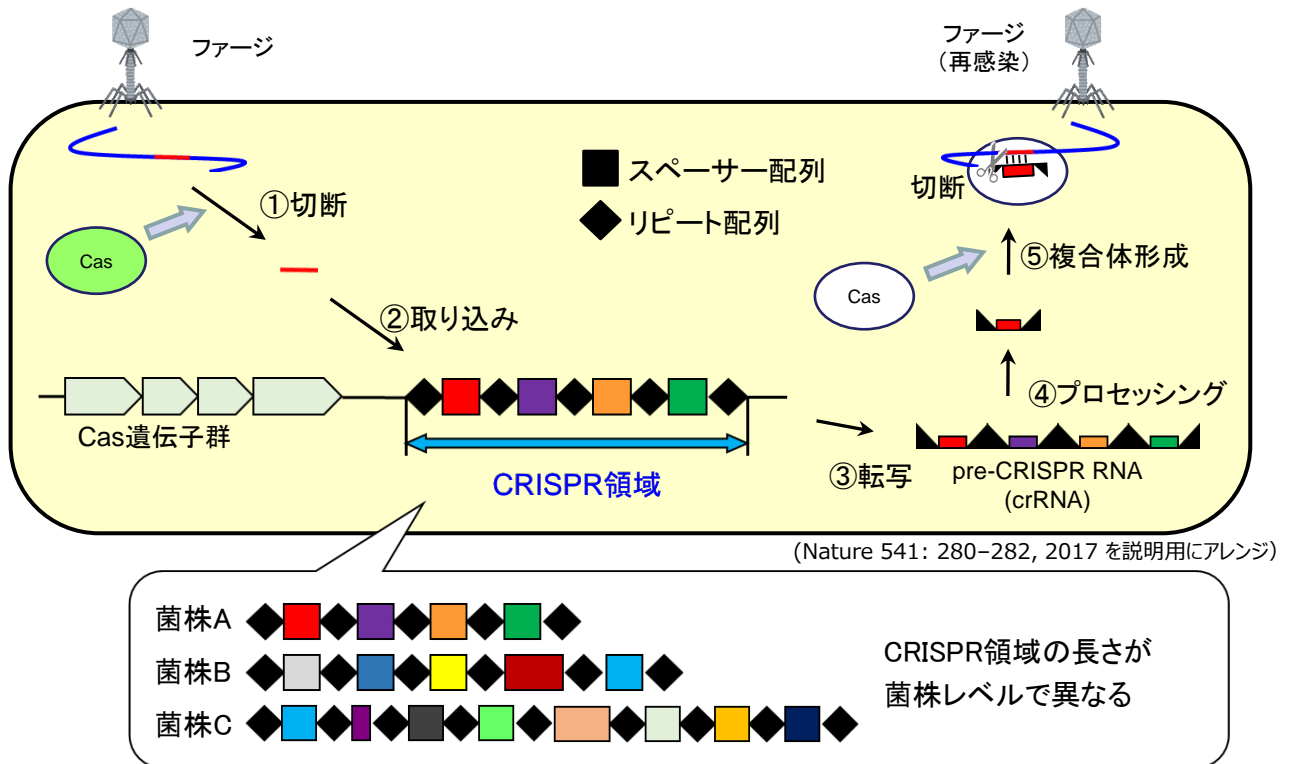


図1: CRISPR-Casシステムを利用した*F. nucleatum*菌株識別ジェノタイプング法の標的

CRISPR-Casシステムは以下のような細菌等の獲得免疫系で、CRISPR近傍に位置するCas遺伝子群から産生されるCasタンパク質が関与する。①菌体内に侵入したファージ等のDNAを、Casタンパク質が切断し、②CRISPRの繰り返し配列間にあるスペーサー部分に取り込み、その遺伝子の侵入を記録する。その後、同じ遺伝子が侵入すると、③CRISPR領域が転写されpre-CRISPR RNA (crRNA) が生成され、④それがプロセッシングを受けてcrRNAになる。⑤その後、Casタンパク質と複合体を形成したcrRNAが、自身の配列と相同性を示す外来DNAを捉え、切除除去する。本ジェノタイプング法は、②の過程で、菌株毎にファージの感染履歴(DNA断片の取り込み履歴)が異なるため、CRISPR領域の長さが異なることを利用する。すなわち、CRISPR領域を挟む位置にプライマーを設計し、PCRの増幅産物(CRISPR関連領域)のサイズ比較することで、菌株の違いを見極めることができる。

完成した*F. nucleatum*菌株識別ジェノタイプング法（以降「本ジェノタイプング法」という）を用いた*F. nucleatum*の各亜種の基準株の解析例を図2に示します。各々のCRISPR関連領域で増幅バンドが検出された菌株はそのCRISPR関連領域を保有していることを示しています。この増幅物の塩基配列を解読したところ、リピート配列とその間のスペーサー配列の繰返しが確認でき、本法で狙い通りCRISPR関連領域が増幅できていることが証明できました。

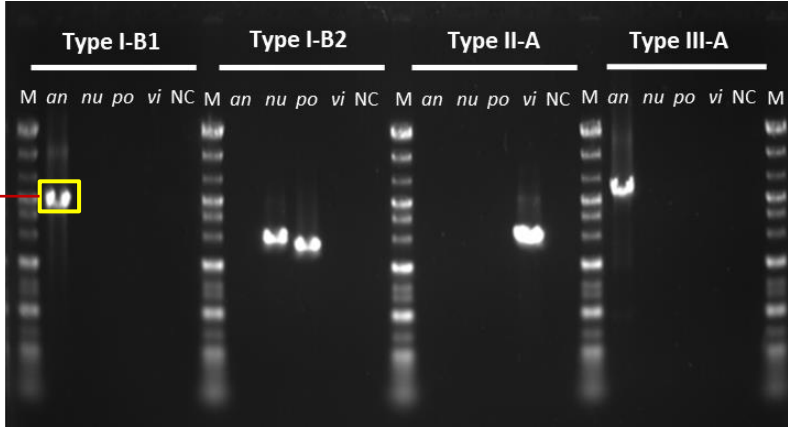


図2：本研究で構築した*F. nucleatum*菌株識別ジェノタイプング法を用いた*F. nucleatum*基準株(4亜種)の解析例。各CRISPR関連領域で増幅バンドが検出された菌株は、そのCRISPR関連領域を保有することを示す。

増副産物（黄色線で囲んだバンド）の塩基配列を解読した結果、リピート配列（赤文字）とその間のスペーサー配列（青文字）の繰返しが確認でき、CRISPR関連領域を正確に増幅できていることが証明できた。本リリースではデータは示さないが、他の増幅産物でも同様に確認できた。

PCR増幅産物の塩基配列確認

リピート配列；スペーサー配列（ファージ等由来の組み込まれたDNA断片）

```

AATTAAAAAG CATAATAGTT GAAAATGAAG ATTTTCGTTTG TATTTTAAAA TCAATAAACCC
CTGATGTTTT TGGAGAAGAA ACTTTGGGAA ACCCAACTCC AAATGGAGAA AATATATTTTC
TATAATTTAA AAATTTTCCC AAGCAATATT CTAAAAAAGT ATTTAAACTT TCCAAAATAT
GATTATTTTA GAAAAATTAA GTAAAAAATA GAATTGCTTG GGAAAAACGT ATAAAAAATA
CTTGTAATAT TGAAAAAAT AAGGTATTAT AAATTTATAA AGCTTGAAAA AATAGCTATG
AACTATAAAC TTGAAAAGTT TTGAAATATA TCATAATCTT GCTTAATTAC GTTATATTTA
ATGAACATA AACTTGAAAA GTTTTGAAAT CTAGCTTAC AGGTGAGATC TGTTAGGTTA
TCTAATATGA ACTATAAACT TGAAAAGTTT TGAAATAATA GATCCTGTAA AAGAAGTTAA
TGCTTCTATT TTATGAAC TAACCTTGAA AAGTTTTGAA ATTGATTATT AGCTCCTGTT
AAAGCCTTAA CTTTAAATGA ACTATAAACT TGAAAAGTTT TGAATATT TTTTCTTTA
    
```

M：DNAサイズマーカー
an： *F. nucleatum* subsp. *animalis*
nu： *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*
po： *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*
vi： *F. nucleatum* subsp. *vincentii*
NC： Negative control

また、複数の菌株が混合している検体において、各菌株が識別できるのかを確認するために、菌株を人為的に混合した複数菌株由来の試料を解析した結果、明瞭に別サイズのPCR増幅物（バンド）が得られ、各菌株を識別することができました（図3a）。さらに、唾液ゲノムDNA試料とその唾液試料から分離された菌株を比較したところ、分離菌株と同サイズのPCR増幅物（バンド）が確認されると共に、唾液試料からは別のサイズのPCR増幅物（バンド）も検出されました（図3b）。これは、培養法では分離し切れなかった*F. nucleatum*菌株が、唾液中に存在していることを示しています。すなわち、試料中の*F. nucleatum*菌株検出力は、本ジェノタイプング法の方が培養法よりも高いことを示しています。

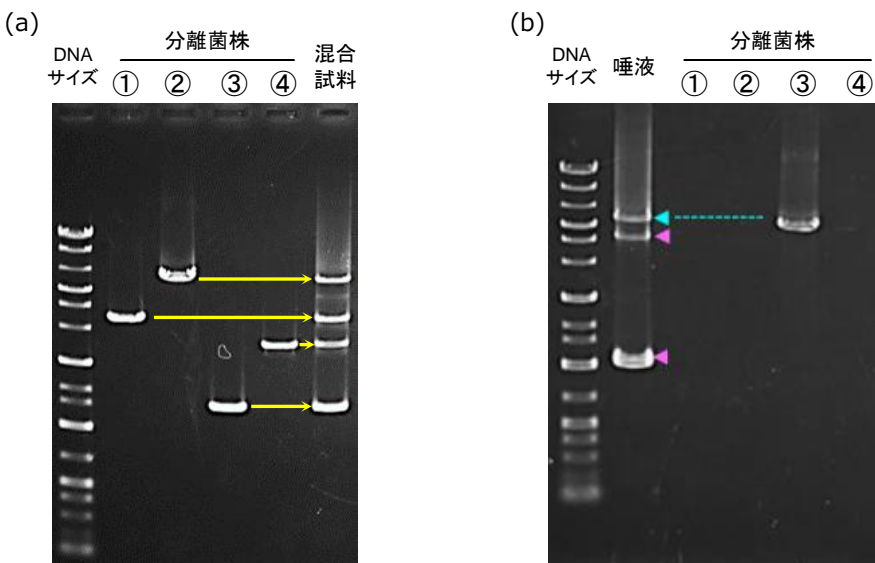


図3：分離菌株の混合試料および唾液試料とその分離菌株を本ジェノタイプング法で解析した結果の一例（タイプI-B1を抜粋）
(a) 同じCRISPRタイプを保有する分離菌株を等量ずつ混合した試料の本ジェノタイプング法での分析結果。混合した各菌株由来のPCR増幅物（バンド）が明瞭に分かれて検出された。
(b) 唾液試料およびその唾液由来分離菌株を本ジェノタイプング法で解析した結果。分離菌株と同サイズのバンドが得られたこと（青色矢印）に加え、培養法では分離し切れなかった*F. nucleatum*菌株のバンド（ピンク色）が検出された。
(a)と(b)の分離菌株は異なる

臨床研究への応用を想定して、培養法で同一菌株が検出された大腸癌組織と唾液の凍結検体および分離菌株を本法で解析しました。その結果、大腸癌と唾液の両検体から、分離された菌株と同じサイズのPCR産物(バンド)が検出され、本ジェノタイプング法は、凍結臨床検体でも有用であることが確認できました(図4a)。そこで、検査等の応用研究を見据えて、口腔内に存在する*F. nucleatum*の継時的変化を菌株レベルで調べる実験を行いました。歯周病を発症している大腸腺腫患者の唾液を対象に、歯科医による口腔ケアの影響を本ジェノタイプング法で調べました。その結果、一部の患者では、口腔内に棲息していた複数の*F. nucleatum*菌株の中の一部が、口腔内ケアにより検出限界以下になることが観察されました(図4b)。これらの結果は、本ジェノタイプング法が、大腸癌に定着し増悪化に関与していると推測される口腔内*F. nucleatum*菌株の存在を明らかにしたり、その菌株の動態をモニターすることで、大腸癌治療後の再発予防などに役立つことを示唆しています。

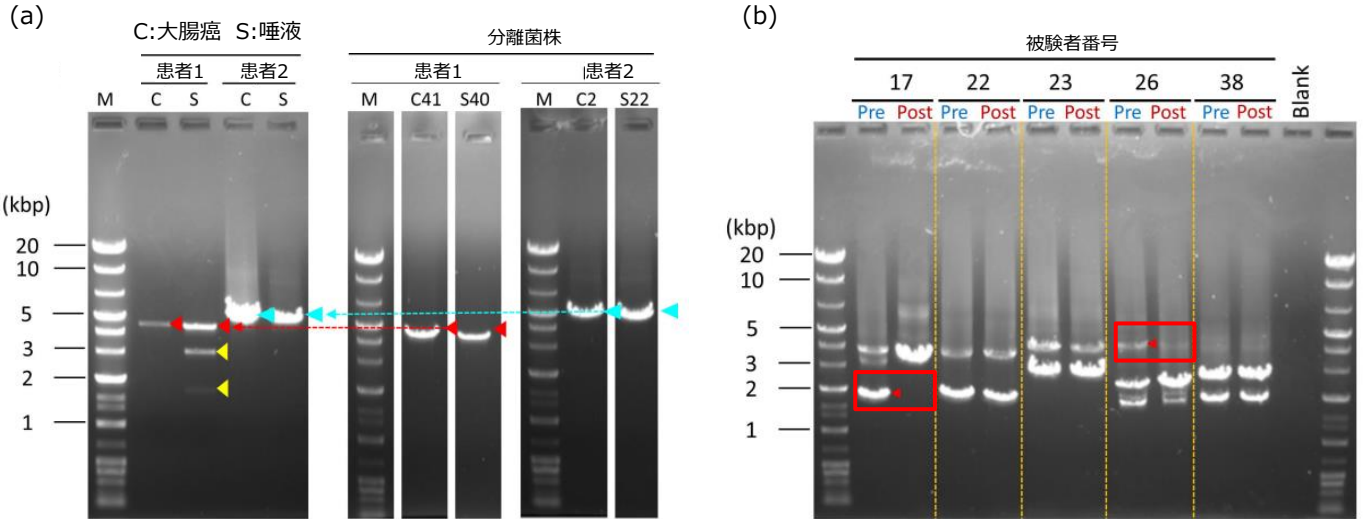


図4：大腸癌患者および歯周病と大腸腺腫の併発患者由来の試料での本ジェノタイプング法の解析結果

- (a) 凍結保存していた大腸癌組織と唾液および分離菌株の本ジェノタイプング法での解析結果。大腸癌組織と唾液の両方から分離菌株と同じサイズのバンド(赤または水色の矢印)が検出された。さらに、唾液中にはそれら以外の菌株(黄色矢印)が存在することも検出された。C41, S40, C2, S22は分離菌株名を示す。
- (b) 歯周病と大腸腺腫を併発している患者の口腔内ケアによる唾液中*F. nucleatum*菌株変動。一部の患者で一部の菌株が口腔ケアにより変動することが捉えられた(赤四角)。Pre：処置前；Post：処置後

さらに、同一菌株と同定された大腸癌患者の癌組織と唾液から分離した*F. nucleatum*菌株ペアをそれぞれ全ゲノム解析し、一塩基変異(Single Nucleotide Variant)の割合を調べました。その結果、同一菌株ペア間の一塩基変異の割合は0.00036%–0.0038%で、別菌株間の1.228%–3.159%より大幅に少ない結果が得られました。この結果は、少なくとも一部の患者は、口腔内と大腸癌に同一菌株由来の*F. nucleatum*が定着していること、すなわち、口腔内の一部の*F. nucleatum*が大腸癌の増悪化に関与していることを示しています。

■今後の展望

当研究グループでは、この手法を用いて多くの大腸癌症例を調査し、また分離菌株のゲノム情報を解析し、口腔内由来*F. nucleatum*と大腸癌増悪化の関連性に関わる知見を集積していく予定です。

本研究成果は、科研費の支援も受けて実施したものです(18K07950, 19K18981, 23K17454)

《用語解説》

※1 菌株：同一種内の生物個体のことであり、ヒトの場合、各個人に該当する。菌株毎に特徴や能力に差が認められる。

※2 CRISPR-Cas [clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)およびCRISPR-associated (Cas)] システム：ファージやプラスミドに対して原核生物が持つ獲得免疫機構として機能するDNA領域。細菌に侵入したファージやプラスミドに由来する外来性遺伝子の一部を、CRISPR領域に取り込む[繰り返し配列(リピート配列)の間に感染ファージのDNA断片(スペーサー配列)を挟み込む]ことで、獲得免疫系として機能するシステム。菌株によって感染履歴が異なるため、菌株毎にCRISPR関連領域の長さ(サイズ)が異なる(図1参照)。

※3 ファージ：細菌や古細菌に感染して増殖するウイルス(バクテリオファージとも呼ばれる)。

※4 AP-PCR法：ゲノム中の繰り返し配列をターゲットにした任意のプライマーを用いて鋳型DNAを増幅させることで、菌株レベルで増幅されるDNA断片のサイズと数に再現性高く差が出ることを利用して菌株を識別する方法。感染性病原菌の菌株特定などに広く利用されている。