

Linking Gut Microbiota to Colorectal Cancer

Hans Raskov¹■ Jakob Burchardt², Hans-Christian Pommergaard³

1. Speciallægecentret ved Diakonissestiftelsen, Frederiksberg, Denmark;

2. Department of Surgery, Zealand University Hospital, University of Copenhagen, Denmark;

3. Department of Surgical Gastroenterology, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark.

■Corresponding author: Hans Raskov, MD., Lundevangsvej 23, DK-2900 Hellerup, Denmark Phone: +45 2441 4031 Email: raskov@mail.dk

論文の意義

- 腸内菌叢と CRC の関連についての研究をレビューし、その意味を議論する
- 腸内菌叢とがんの側面性、化学療法への影響についての発見を紹介する

概要

- 前臨床と臨床データから大腸がんの発がん と菌叢に強い相関があることを示した
- dysbiosis との発がんの関係は菌の活性によるもの
- 大腸がんの発生や促進と菌の活性との関係は主に3つに分けられた
 - ※菌の活性が直接関係する
 - ※菌の代謝物が関係する
 - ※菌による炎症や炎症経路が関係する
- 最近の大腸がん と菌叢のテーマ
 - ※クオラムセンシング(QS)
 - ※バイオフィーム形成
 - ※がんの側面性
 - ※菌叢とプロバイオティクスの化学療法への影響

導入

- 大腸がん(CRC)は長年の変異の蓄積からなる遺伝子疾患
 - ※殆どは孤発性 CRC、リンチ症(HNPCC)と家族性腺腫性ポリポーシス(FAP)による CRC は少数
- 一般的な原因は CIS(主に孤発性 CRC)と MIS(主にリンチ症)、FAP の場合 APC 遺伝子の生殖細胞系列変異が原因
- 菌叢摂動が遺伝子やエピジェネティクスに変化を与え、CRC の進行と関与するという仮説
- 腸内菌叢の eubiosis 状態は宿主の健康に重要
 - ※失調は慢性炎症、IBD や IBS などの胃腸疾患、肥満、2 型糖尿病、代謝症候群などの全体的疾患に関与
- 近年では菌叢と CRC の関連がよく研究され、失調とそれに関する免疫応答と CRC 発がん、予測との関連性が明確
- 菌叢は基本安定であり、いくつかの要因で多様性を失い、炎症性になる
- 菌叢の操作が腫瘍発生の進行を変更
 - ※細菌ドライバーの候補、発がん性代謝物、腔内現象、炎症経路などの研究
- 16S rRNA と WGS シーケンシングから CRC と菌叢の多様性低下、腫瘍発生病菌の増加との関連

CRC について

- 人口の 5-7%が患っており、CRC は西欧米、US、AUS、NZ の一般的な悪性腫瘍
 - ※がんによる死亡原因のトップの 1 つでもある
- 東洋の国々でも CRC の件数が上昇、世界全体の CRC 負荷が 60%上昇
 - ※2030 年では CRC の件数が毎年 220 万、CRC による死亡数が 110 万に上ると予測
- 最近の話題は原発腫瘍の側面性と右側面性 CRC 患者の無増悪生存、全体的生存の減少への影響
 - ※がんの側面性によってバイオフィーム形成が異なる
- 細菌のバイオフィームは初期がん(悪性化前の段階)における独立したドライバーで CRC 進行と関連

CRC 発がんの分子経路

- CRC の 90%は孤発性、生殖細胞系列変異による CRC は稀
 - ※殆どの CRC に見られる変異は主に CIS と MIS
- FAP からの CRC は CRC 件数の 1%以下、5q22 染色体の APC 遺伝子のフレームシフト変異が原因
 - ※生殖細胞系列における変異であるため、FAP が 40 歳前の CRC を促進するとされる

- ulcerative colitis 患者の 20%が発病後 30 年以内に CRC を患い、慢性炎症(UC の症状の 1 つ)が発がん と関連
 - ※IBD は CRC の重要なリスク因子の 1 つ
- 成人早期の長期間抗生物質使用と後の大腸腺腫との関連が菌叢と異常増殖と関連
- 生殖細胞系列由来のがんや遺伝的がん以外では、CRC の進行には何十年もかかる
- 特定の菌種が発がんを起こすのは証明されず、腺腫癌腫経路に菌叢摂動や失調などの管腔現象、環境要因の関連

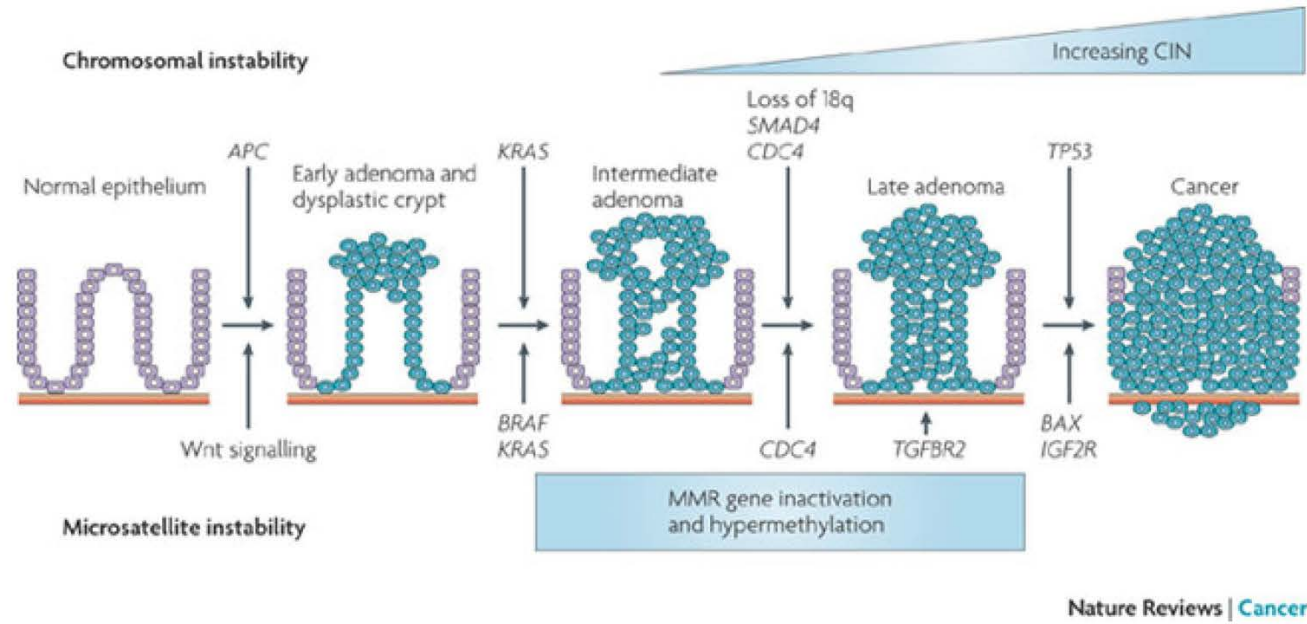


Figure 2. Adenoma-carcinoma sequence. CIS involves loss of APC function and KRAS, followed by loss of chromosome 18q with SMAD4 and mutation in TP53. MSI CRC is characterized by a deficiency of the MMR leading to slippage in microsatellites. CIN: chromosomal instability. From Walther & al. Nat Rev Cancer 2009;9:489-99. Permission from Macmillan Publishers Limited.

結腸と菌叢

- 腸内細菌はヒト細胞より多く、それらのゲノムはヒトゲノムの 150 倍
 - ※ヒト結腸は地球の最も高密度な微生物と提唱され、その濃度は 10^{11} 細菌/内容物で、小腸の何万倍
- 腸内細菌は残留食物、腸分泌物と死んだ結腸細胞を代謝する多様な常在菌からなる生態系
- タンパク質の高摂取によってタンパク質分解発酵が増加
 - ※フェノール化合物,NOC,アミン,アンモニアやインドールは上皮細胞の増殖と分化への発がん性影響
- 結腸の代謝は主に発酵によるデンプンやタンパク質からの栄養素とエネルギー抽出
 - ※ヒトの 1 日エネルギーに必要なエネルギーの 1 割だけでなく、大量の熱も生成
- 菌叢とヒト組織は粘膜層(1 枚の上皮細胞層)によって分離→粘膜層と免疫系で上皮細胞が病原菌から保護
 - ※それらが突破されると慢性炎症状態
- 菌叢は様々なヒト遺伝子発現に影響
 - ※例えば、*Bifidobacteria*, *Lactobacilli* と *E. coli* の特定な株はムチン遺伝子、マクロファージや樹状細胞の TLR、カスパーゼ発現など影響し、免疫活性やアポトーシスを調節
- eubiosis では常在菌と免疫細胞が炎症性、前駆発がん性遺伝子と抗炎症、腫瘍抑制遺伝子の平衡を維持
- 細菌以外、菌叢には多数のウイルス、原生生物、アーキア、真菌類があり、結腸細菌の 99.9%は絶対嫌気である
- 菌叢と人体は共生関係であるが、別の組織に植菌すれば病原性を示す
- 結腸の管腔菌叢と粘膜菌叢は異なり、管腔菌叢の多様性が高く、便試料の菌叢は粘膜菌叢の指標ではない
- 菌叢は長期間安定しているが、成人早期と年齢者では異なり、特に Firmicutes 門の比率は加齢につれて減少する
- 66 OTU からなるコアー菌叢が約 40%のヒトに共有されるが、正常な菌叢は不明
 - ※60%のヒトの菌叢は変動であり、複数の宿主因子の組み合わせによって決定
 - ※個体ごとに特有な菌叢(微生物指紋)はあるが、健康な個体での細菌系統型の存在量と分布は同様
- 加齢と CD4 T 細胞減少によって菌叢の多様性が低下→炎症性構成→健康問題と発がんに関連
 - ※原因の 1 つは T 細胞分化の減少による免疫系の結腸内の腫瘍抑制能力の低下
- CRC 発生と特定な菌株との関係
 - ※保護的、酪酸生成グラム陰性菌と炎症性、ムチン劣化性グラム陽性菌という傾向
 - ※乳酸菌減少と Fusobacteria, Staphylococcaceae, Porphyromonadaceae の増加

- 同個体から取れる腺腫組織、ポリープ付近と正常粘膜の菌叢に大差ない→ 発がんの初期段階から **CRC** 特有の菌叢
- 特定の発がん性菌株より、特定の細菌構成とそれらの代謝物が連続的、慢性炎症と免疫系の変化を通して発がんに関与する環境を形成すると思われる

Table 1. The gut microbiota is dominated by five bacterial phyla
Firmicutes (50-60% of the microbiota) including more than 180 species of Lactobacillus, Clostridiales and Streptococcaceae.
Bacteroidetes (25-40% of the microbiota) with Bacteroides Fragilis and Porphyromonadaceae both reported upregulated in CRC
Actinobacteria (2-5%) including the Bifidobacteriae
Proteobacteria (2-5%) E. coli, salmonella, yersinia, shigella, vibrio, haemophilus,
Fusobacteria (2-5%) Fusobacterium Nucleatum, faecalibacterium prausnitzii

粘膜防御機構と炎症

- 健康な個体では大腸上皮細胞の構造と機能及び免疫系によって菌叢宿主の相利共生が維持
- eubiosis 維持は胃腸障壁の状態と栄養素摂取、ビタミン生成への参加の維持に重要
※健康的な菌叢は食物成分とその他の腔内物質を有益、無益、病原性に分け、取り扱う
- 菌叢宿主の間の粘膜層は細菌侵襲への物理化学的障壁や菌叢、宿主と腔内環境とのやり取りのバランス維持する
- eubiosis では生理的、制御された低級炎症が腸壁に起こる
※免疫系が自然に発生する微生物を認識するため健康な菌叢は宿主の粘膜における大きな炎症反応は起きない
- 免疫系は PRR に基づく免疫記憶を持っており、無害の常在菌と潜在的病原性微生物を見分けできる
※PRR は主に細菌表面分子(MAMP や PAMP と呼ばれる細菌 LPS,リポタンパク質,原核生物 DNA,外来核酸)を認識
- PRR に TLR と NLR というグループがある
- TLR シグナル伝達は炎症性サイトカイン生成、タイトジャンクションと密着結合強化する
- DAMP は TLR9 を活性化させ、自己破壊的、慢性な B 細胞免疫応答を起こす
※長期的 TLR9 誘引が消化管における腫瘍の成長、拡散の促進につながる
- NLR は 食作用や細胞膜微孔から入る病原菌を検出し、免疫細胞や非免疫細胞の細胞質に存在
※NLR 活性化は炎症性サイトカイン生成やオートファジー誘引につながる
- PRR の変異や障害で粘膜層が薄くなり、炎症反応が定常化する
※特に NOD2 変異はクローン病、CRC リスク増加、CRC 予測悪化に関連
- 失調は病原菌侵襲、成長援助、免疫系と粘膜障壁恒常性妨害、炎症による透過性増加、腸内の連続性炎症と関連

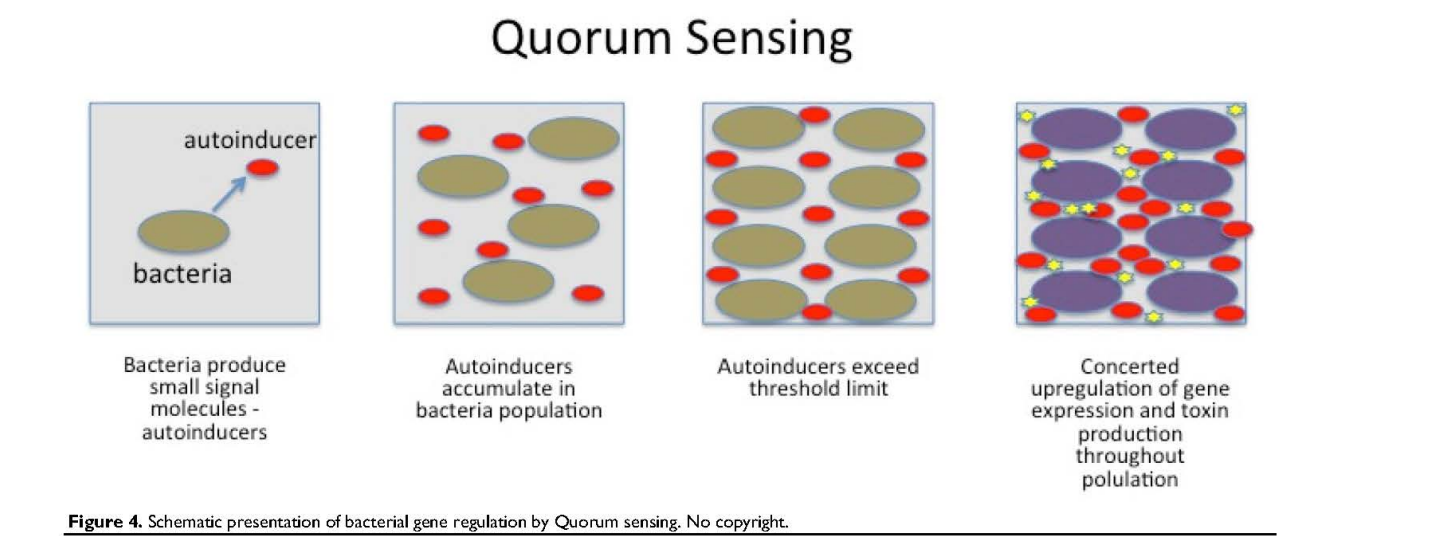
菌叢と発がんと炎症との関連

- 菌叢と自然免疫系に病原菌が侵襲すれば、腫瘍抑制の抗炎症環境は免疫細胞の活性化で変化
- いくつかのサイトカインはマーカーや標的として用いられ、CRC 患者の予測向上
※無再発生存と全体的生存の予測には Immunoscore が MIS 検査よりいいという変量解析の結果
- eubiosis が傷害→CD4 T 細胞が炎症性 Th17 細胞に分化→病原菌への獲得免疫応答
※長期粘膜炎症での Th17 の存在が CRC 発達に関連
- CRC 組織への Th17 侵襲、IL-17 や IL-22 の Th-17 分裂促進サイトカインの増加が予測悪化、生存減少に関連
- 特定の常在菌、特に *Clostridia* と形成異常細胞は腸粘膜 Th17 蓄積や上皮細胞 Th17 生成増加を促進
※Min マウスモデルでは Th17 が CRC の重要な因子であり、マウスを ETBF に暴露
※実験環境では調節 T 細胞死滅による Th17 制限が微小腺腫形成を減少
※CD3+(もしくは CD8+)が侵襲した腫瘍は CRC の無病生存と全体的生存の向上と関連
- IL-6 は CRC 発達、がん組織の血管形成に重要な強力な炎症性サイトカインで、STAT3 の活性化と腫瘍振興と関連
※血中内の IL-6 増量は腫瘍サイズ、肝臓腫瘍転移 CRC 患者の悪い生存の予測マーカー
- 炎症性細胞とマクロファージ由来 TGF-β は細胞成長、分化とアポトーシスに重要
※正常 TGF-β は異常な細胞増殖を阻害、腫瘍間質線維芽細胞の TGF-β は CRC 細胞の増殖と転移能力を促進
- マクロファージが生成する TNF は強力な炎症性サイトカイン
※炎症細胞取り込み、血管透過性、分裂促進シグナル、上皮細胞 Wnt, NF-κB シグナル活性化で成長と生存を制御
- 上皮細胞に TNF 与えると CIS と変異率が上昇→TNF とがん発達の直接的な機構
※CRC 患者の疾患進行と低い生存は血中 TNF 量と正相関

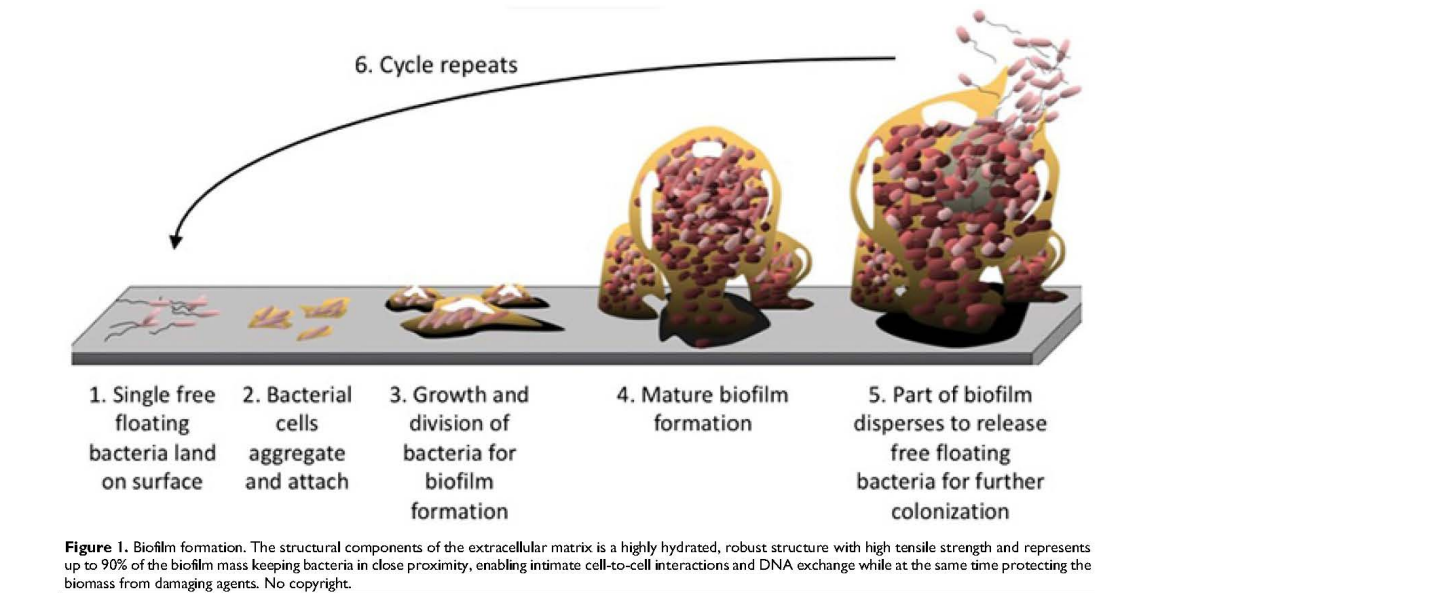
- 炎症の病態生理学機構の 1 つは酸化的負荷による DNA 損傷、形成異常、腫瘍促進の環境形成である
- NFκB は遺伝子の複合体を制御し腫瘍細胞をアポトーシスから保護し、増殖を増加させる
※肥満では殆どの組織における NFκB 発現が増加し、2 型糖尿病リスク増加
※NFκB は肥満、2 型糖尿病、心血管疾患、IBD とがんを関連付ける因子とされる

宿主免疫系の回避

- 細菌は QS やナノチューブでやりとりし、それが病原性に重要
※QS 阻害とバイオフィーム形成阻害は次世代抗生物質で、腫瘍発生に影響する
- 細菌の攻撃が成功するのにタイミングと連絡が大切で、QS によってそれが行える
※遺伝子発現が増加すると、バイオフィーム形成が始まる



- バイオフィーム形成で病原菌が広範囲宿主ニッチに生存、自然免疫系を回避し、厳しい環境で生存可能にする
※結腸では粘膜層の内側にバイオフィームがあり、細菌が結腸細胞に接近し、炎症起こす
- 健康個体の 15%、右側面性 CRC のほぼ 100%にバイオフィームが見られる
※右結腸曲付近のバイオフィームは上皮細胞の KRAS と BRAF 変異と右側面性がんの予測悪化と関連する
- 細菌は自分の表面抗原を炭水化物でコーティングして免疫系と PRR 認識を回避し、新たな領域に侵襲する
※ 遺伝子発現の on/off、宿主の免疫応答の変化、酵素や下流炎症性サイトカインへの影響などの免疫回避もある
- 細菌は宿主に付着→強制的に宿主細胞に侵襲→中に入ったら宿主細胞を trojan horse のように用いて増殖
- 免疫系に直接細胞毒素を注入する細菌、食作用回避方法を持つ細菌など、細菌の吸収や死滅回避方法は多様に渡る



ドライバー、パッセンジャーとキーストン病原菌

- 菌叢による発がん機構は発がん性毒素の分泌から炎症経路操作に至る
- ドライバースパッセンジャーモデルでは菌叢に DNA 損傷とゲノム不安定化ドライバース細菌の存在を定義
※ドライバースは後にパッセンジャーと入れ替わり、パッセンジャーには腫瘍促進、腫瘍抑制性質がある
※細菌が侵襲する際、パッセンジャーは何もしないが、後で活性化することはある
- キーストン病原菌仮説では特定の菌腫の影響は存在量に対して不相応に大きい
※存在量が少ない病原菌でも失調、透過性増加、粘膜障壁突破、慢性炎症、炎症疾患、発がんに関与

特定の細菌について

- 失調の多様性で、特定ながん関連失調パターンはない
※病原性因子、粘膜障壁障害、長期的炎症、細菌共同体の構造と代謝活性などの協奏的効果が発がんに関与
- CRC 患者とコントロールの菌叢に差があるという報告が複数あり、全体的に多様性低下と失調が見られる
※特に Firmicutes, *Bacteroides* と乳酸菌低下、*Fusobacterium*, *Porphyromonas* の増加
- 実験環境では、Proteobacteria、特に *Lactobacillus*、の存在量は腫瘍負荷負相関
- Bacteroidetes と Proteobacteria 常に腫瘍の数と負荷を増加させる門に含まれる
- 優勢である Bacteroidetes と Firmicutes 門のバランスと疾患の進行が関連する
- 22 菌種相対存在量に基づいたメタゲノムでの CRC 予測は便潜血検査と同等な精度(50%の正解率で 10%の偽陽性)
※両方の方法で予測すれば正解率 70%

Fusobacterium nucleatum(FN)

- FN は嫌気性のグラム陰性菌で、CRC 関連粘膜と腺腫患者の粘膜での増量、腫瘍組織での増量と侵襲も見られる
- FN の FadA 分泌→上皮細胞の e-cadherin 複合体が機能不全→細胞質の β -catenin 結合阻害→増殖異常
- 高い FN 量は MIS とも関連され、最高の FN tertile の個体の腺腫リスクは 3 倍上昇
※腺腫性ポリープの CRC への悪性化につれて FN が増え、腺腫、腺癌患者の FN は正常の個体の 10-100 倍高い
※予測マーカーとして使えるかどうかについて研究される
- FN は腫瘍微小環境によく発見され、NK 細胞機能を阻害するとされる(Fap2 と TIGIT の相互作用によって)
- APCmin マウスの発がんを促進し、FN は典型的なドライバースであり、結腸での増殖には他種との相互作用が必要

腸内毒素原性 *Bacteroides fragilis*(ETBF)

- Bacteroides fragilis*(BF)は菌叢の約 1%を占める一般的な嫌気性常在菌であり、ETBF はその 1 種である
- ETBF の病原性は ETBF 毒素(fragilysin)で、結腸の上皮細胞受容体に結合する Zn 依存性金属プロテアーゼ毒素
※ETBF 毒素によって上皮細胞の構造と機能が急激に変化する
- ETBF と ETBF 毒素は 100%の後期 CRC に見られ、min マウスへの植菌の一ヶ月後に腺腫と結腸腫瘍が形成

Eschericia coli (*E. coli*)

- E. coli* は Proteobacteria に属する通性嫌気性常在菌で、その中に IBD と CRC と関連する病原性 B2 株がある
- B2 株は”pks”遺伝子を持ち、colibactin というポリケチドポリペプチド遺伝毒素を生成
※colibactin は細胞核に移動し、DNAse として働き、染色体を異常化させる
- 無菌マウスの腸粘膜に IgA 生成細胞が少なく、*E. coli* B2 や *E. faecalis* 植菌によって炎症
※*E. coli* B2 植菌だけが結腸腫瘍に展開、colibactin を発がん性細菌代謝物として同定

Porphyromonas (PM)

- PM の上皮細胞層障害→侵襲と植菌可能化→アポトーシス阻害、TNF α 、NO 合成酵素発現増加→腫瘍発生の環境

細菌代謝物—短鎖脂肪酸(SCFA)と二次胆汁酸(SBA)

- SCFA とは probiotic が生成した酪酸、酢酸、プロピオン酸、吉草酸で、様々な効果を与える
※Bacteroidetes と Firmicutes 門は酢酸とプロピオン酸、Bifidobacteriaceae は酪酸の主産菌である
- SCFA を遊離させるだけでなく、アミノ酸発酵によって CRC や IBD に関与する有害物質を生成
- 酪酸生成菌の減少によって結腸内 pH 値が高くなり、腫瘍が発生しやすくなる
- 常在菌による一次胆汁酸(PBA)の脱水素化によって SBA が生成
※SBA の一種である DOC はアポトーシス耐性、ROS と RNS 生成などによって腫瘍を発生しやすくする

Table 2. Beneficial effects of SCFA produced by probiotics

Predominant energy source for colonocytes
Induction of mucin synthesis
Augmentation of tight junction assembly
Mediation of cross-talk between commensals and host immune system for maintenance of gut homeostasis
Conditioning gut epithelial cells to mount protective immunity through MAP kinase signaling
Inhibiting pro-inflammatory cytokines, NF κ B and TNF α
Inactivation of mutagens

動物実験

- 炎症モデル(AOM/DSS)の動物実験の初期菌叢から腫瘍の発達の予測と発がんに対する抗生物質治療が可能
- gnotobiotic マウスに慢性炎症 CRC マウスの菌叢を植菌すると腫瘍の数が増加
※健康なマウスの便で植菌すると腫瘍発生が減少する
※無菌条件下では IL-10 や p53 ノックアウトマウスは CRC にならない
- AOM/DSS モデルではマウスに抗生物質を投与し、IL-17 を抗体で妨害すれば腫瘍が発生しない
- 結論として、菌叢の摂動が発がんの遅延、菌叢宿主相互作用による腫瘍リスクへの関与が示される

化学療法

- いくつかの化学療法剤(oxaliplatin など)は菌が引き起こす MyD88 シグナル伝達に依存
※免疫治療の有効性は常在菌に依存する
- 臨床試験から原発腫瘍が右側面性の mCRC 患者での EGFR 抗体の効果は薄く、バイオフィーム形成と関連
- 動物試験から oxaliplatin と cyclophosphamide の最適効果に健康な菌叢が必要
※*in vitro* 研究から健康な菌叢が 5-fluorouracil の応答増加、延長を示した
- がん患者における抗生物質投与は丁重でなければならない
- 手術や化学療法からの回復に乳酸菌の増加や SCFA と菌叢の調整が有益
- 菌叢を標的にすることで化学療法剤の効果の向上

肥満、炎症とがん

- 欧米では 16%の成人が肥満であり、11%の CRC 件数が肥満と関連
- 肥満は多数の器官や組織、特に脂肪組織、の低級炎症と関連
- 門レベルでの変更、多様性低下、細菌遺伝子と代謝経路の変化などにおいて肥満個体の菌叢の種類は異なる
- 疫学データから肥満と CRC リスクの 30-70%増加と関連され、再発と死亡率にも関連される

結論

- 失調は結腸粘膜における炎症性応答と有害環境を形成、形成異常と悪性化は菌叢での他菌種変化と関連
- CRC 発がんは菌叢の関連を支援するデータがあり、CRC 治療や防止のための菌叢調節の探索
※細菌の行動の理解、特に菌叢宿主相互作用の理解
※調節には食生活、prebiotic, probiotic, antibiotic
- バイオフィームは形成異常と悪性化を促進させ、結腸粘膜層へのバイオフィーム侵襲は病原状態を意味する
- probiotic とそれ由来の SCFA は従来の CRC 治療と合同に行える安全なツールで、有効性は臨床試験で証明
- 便や菌叢移植(MT)は CRC の新たな概念で、CRC への影響はまだ解明されない
- prebiotic, probiotic と MT による菌叢恒常性回復
- QS 阻害剤やバイオフィーム形成阻害剤が細菌による CRC 発がん進行を変化させる重要なツールになる

感想

- 研究する前に必要な前提知識があまりなく、これから少しずつ勉強しながら研究を進める
- 読むのが大変けど、新しい概念とかもあって面白い論文と思う
- これから CRC の治療に QS やバイオフィーム、菌叢調節を重要視していくのかなと想像する
- 論文を読むと時々書いていることはどこまで信用できるのか考えないといけない

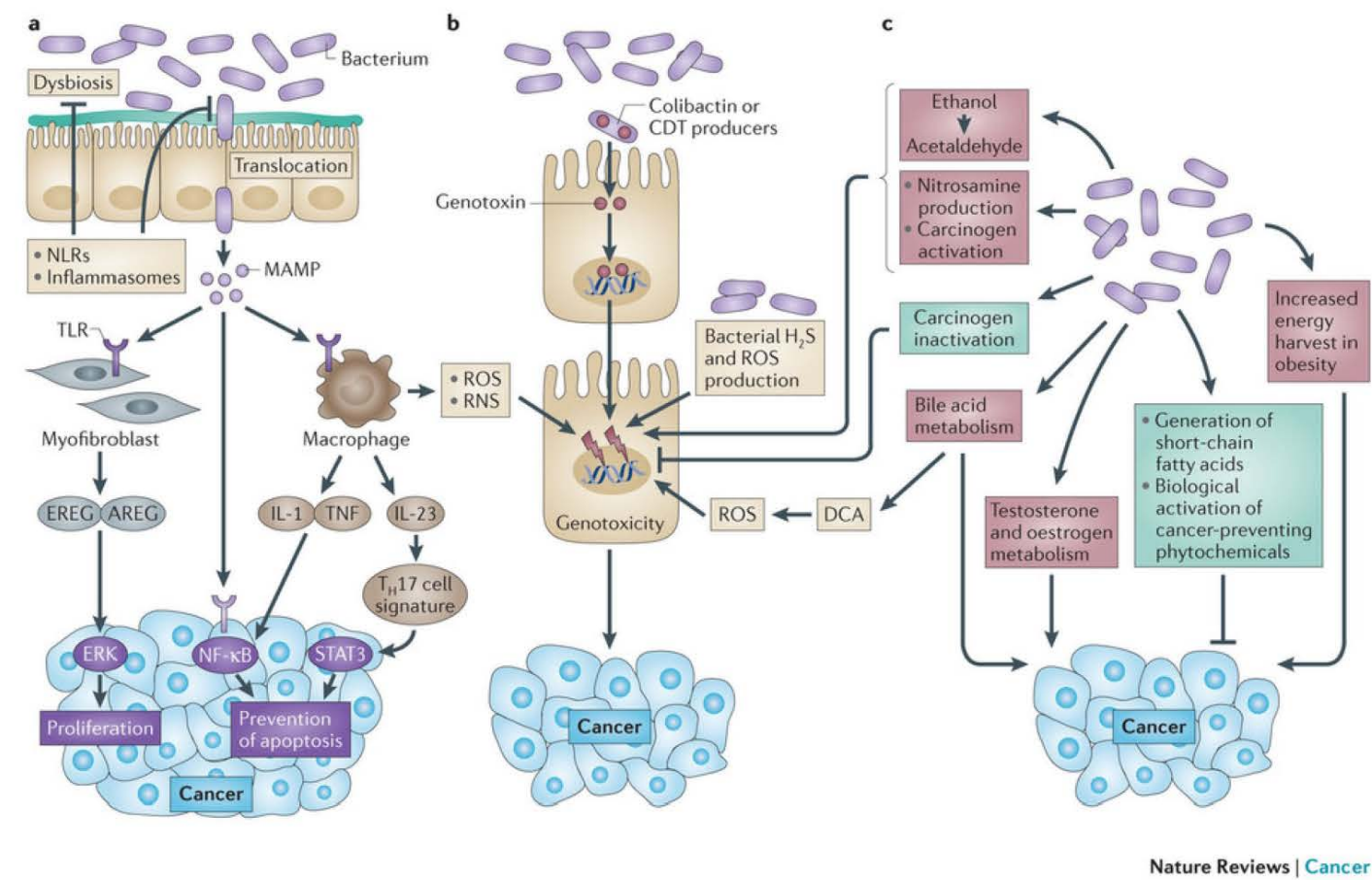


Figure 3. Mechanisms by which the bacterial microbiome modulates carcinogenesis. The microbiota promotes carcinogenesis through different mechanisms. **A** | Dysbiosis and inflammation induced by MAMP activating TLR and other PPR (e.g. NLR). **B** Detrimental effects are mediated by bacterial toxins such as colibactin and CDT: Cytolethal Distending Toxin, ROS, Reactive Nitrogen Species and H₂S. **C** Metabolic actions activating toxins such as acetaldehydes and nitrosamines. The microbiota mediates preventive effects (in green) through inactivation of carcinogens and production of SCFA: short chain fatty acids; such as butyrate and propionate. From Schwabe RF, Jobin C. Nature Reviews Cancer 2013;13:800-12. With permission from Macmillan Publishers Ltd.

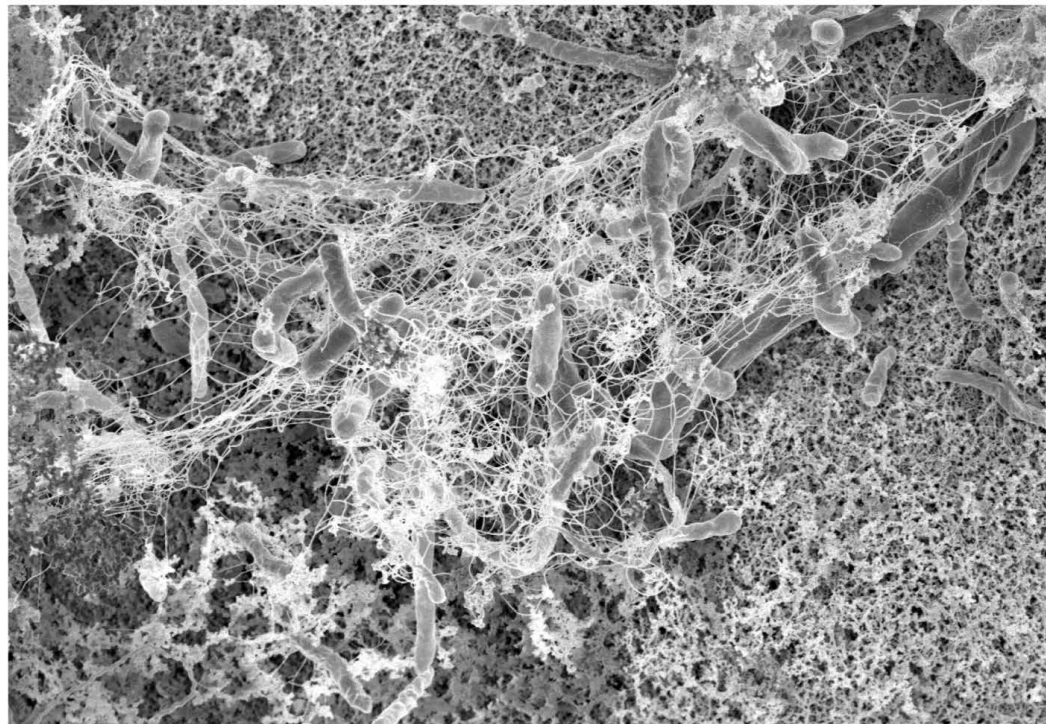


Figure 5. Early stage of bacterial biofilm with visible intercellular polymeric matrix.