Linking Gut Microbiota to Colorectal Cancer

Hans Raskov1, Jakob Burcharth2, 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](mailto: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(腸内菌叢共生バランスの失調)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

→バイオフィルム形成

→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であり、その殆どは孤発性CRCで、それに比べリンチ症(HNPCC)と家族性腺腫性ポリポーシス(FAP)によるCRCは少数である
* 孤発性CRCの原因はCIS経路の変異、リンチ症の原因はMIS経路の変異、FAPの原因はAPC遺伝子の生殖細胞系列における変異というのが一般的である
* CRCの原因である変異は主に腫瘍抑制遺伝子のLOF変異と発がん性遺伝子のGOF変異である
* 菌叢における摂動が遺伝子やエピジェネティクスに変化を与えるように見えるため、菌叢摂動がCRCの進行への影響があると考えられる
* 腸内菌叢の共生バランスが整っていること(eubiosis状態)は宿主の健康に重要である
* 失調は慢性炎症、IBDやIBSなどの胃腸疾患だけでなく、肥満、2型糖尿病、代謝症候群などの全体的疾患にも関与するとされている
* 近年では菌叢とCRCの関連がよく研究されており、失調とそれに関する免疫応答とCRCの発がん、予測との関連性が明確である
* 菌叢は長期的に安定であるが、老齢化、肥満、西洋の食生活、運動不足、疾患や抗生物質など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できると思われるため、細菌ドライバーの候補、発がん性代謝物、腔内現象、炎症経路などがよく研究されるようになる
* 16S rRNAとホールゲノムショットガンシーケンシングの研究によってCRCと関連される菌叢の多様性低下および腫瘍発生を促進する最近の増加を示した

CRCについて

* 人口の5-7%が患っており、CRCは西欧米、US、AUS、NZにおける一般的な悪性腫瘍であり、がんによる死亡原因のトップの1つでもある
* 生活と食生活の西洋化に伴い、東洋の国々でもCRCの件数が上昇し、2030年ではCRCの件数が毎年220万増え、CRCによる死亡件数が110万に上ると予測される
* 最近で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について注目を浴びる
* 幾つかの研究結果の予測的解析から、右側面性CRCの患者はRAS型に関係なくEGFR抗体の利点が得られない
* また、がんの側面性によってバイオフィルム形成が異なり、正常の腸粘膜のバイオフィルムが採取できるかどうかはそのがんの側面性と100%一致した(右側面性が89%陽性、左側面性が12%陽性)
* 細菌のバイオフィルムは初期がん(悪性化前の段階)における独立したドライバーとされており、その行動がどのようにCRCの進行を促進させるのかはいくつか提唱された(例：結腸クリプトのe-cadherin減少、腸透過性増加、ポリアミン代謝物生成とアセチル化、IL-3やSTAT3シグナル伝達の誘引増加など)

CRC発がんの分子経路

* CRCの90%は孤発性であり、生殖細胞系列変異によるCRCは稀であり、殆どのCRCに見られる変異は主にKRAS, APC, MYC, Wnt, p53変異によるCIS経路とMMR遺伝子変異によるMIS経路である
* FAPからのCRCはCRC件数の1%以下を占めており、5q22染色体のAPC遺伝子のフレームシフト変異が原因
* APC遺伝子の変異によってAPCタンパク質が短くなり、e-cadherin複合体の細胞質部位とβ-cateninの結合を阻害し、遊離β-cateninが細胞核に移動しWntシグナル伝達を増幅させ、異常な細胞増殖を起こす
* 異常な細胞増殖によって複数の腺腫が発生し、それらの悪性化によってCRCが発生する
* それらが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を患うため、慢性炎症(UCの症状の1つ)が発がんと関連すると言われており、それによってIBDはCRCの重要なリスク因子の1つと認められている
* 116研究のメタ解析からIBD-CRCの診察結果が43歳で、孤発性CRCより10-15年若いことや非ステロイド性抗炎症剤(NCAID)の長期使用が生涯のCRCリスクを減少させるということから炎症は発がんと関連すると言われる
* 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の関連につながる
* 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CRC発がんのきっかけになる重要な発がん性遺伝子と腫瘍抑制遺伝子における強力な変異が蓄積するのに何十年もかかる
* 特定の菌株が発がんのきっかけになることはまだ証明されないが、腺腫癌腫経路の理解は菌叢摂動や失調のような管腔現象、環境要因を含むようになる

結腸と菌叢

* 腸内細菌はヒト細胞より少し多く、それらのゲノムはヒトゲノムの150倍であり、ヒト結腸は地球の最も高密度な微生物であると提唱され、その濃度は1011細菌/内容物であり、小腸の何万倍である
* 小腸の厳しい化学環境にも関わらず、小腸癌のリスクはCRCの12倍低く、発がんと菌叢の関連の可能性を示す
* 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日和菌からなる生態系である
* 結腸はビタミン生成、水分と電解物吸収、排便のため排泄物の直腸への運搬などをする器官である
* 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し、その生成物(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をもたらすと考えられる
* 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であり、ヒトの1日エネルギーに必要なエネルギーの1割および微生物に大切な安定した腔内現象と安定な体温の維持に重要な熱も生成する
* 菌叢とヒト組織は粘膜層とも呼ばれる1枚の上皮細胞層によって分離され、粘膜層と免疫系によって上皮細胞が病原菌から守られ、それらが突破されると慢性炎症状態を起こす可能性がある
* 結腸クリプトの底に幹細胞が結腸細胞に増殖し続け、それによって結腸細胞は表面に向けて1細胞位置/時間で移動し、表面についたら結腸細胞が剥離され死滅する。それで結腸クリプトや粘膜層全体は数日ごと新装される
* 菌叢は様々なヒト遺伝子発現に影響し、例えば、*Bifidobacteria*, *Lactobacilli*と*E. coli*の特定な株はムチンの遺伝子、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する
* eubiosisでは日和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する
* 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
* 菌叢と人体に共生関係があっても、ほとんどの微生物は別の組織では病原性を示し、病院感染は主にグラム陰性菌によるもので、ほとんどの嫌気性感染ではBacteroidetesが発見され、高死亡率を示す
* 結腸の管腔菌叢と粘膜菌叢は異なり、粘膜菌叢より管腔菌叢の多様性が高く、それで便試料の菌叢は粘膜菌叢の指標に適さない
* 粘膜層の奥側にある粘着性微生物の方が上皮細胞と接近できると思われるため、それらの方が発がん性に重要と考えられ、それらの数は粘膜層表面や管腔にいる微生物の数に比べて少ない
* 菌叢の一部は宿主の遺伝子によって決定され、個体の生涯において常に変化していく
* 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、正常な菌叢については未だわからず、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される
* 個体ごとに特有な菌叢(微生物指紋)は見られるが、健康な個体の間の細菌系統型の存在量と分布は同様である
* 加齢とそれに伴うCD4 T細胞減少によって菌叢の多様性が低下し、炎症性構成になり、それが健康問題と発がんに関連され、その原因の1つはT細胞分化の減少によって免疫系の結腸内の腫瘍抑制能力の低下である
* 加齢による酪酸生成菌の減少(特にFirmicutes門の)が結腸細胞の主エネルギー源の減少と結腸内pH値の増加につながり、pH値増加、炎症と失調が結腸細胞にとっての有害環境を形成し、腫瘍発生に関与する
* CRC発生と特定な菌株との関係を見れば、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が見られ、乳酸菌減少とFusobacteria, Staphylococcaceae, Porphyromonadaceaeの増加が見られ、FusobacteriaとPorphyromonadaceaeは口腔がんを相乗的に促進すると知られている
* 同個体から取れる腺腫組織、ポリープ付近の菌叢と正常粘膜の菌叢に大差がなく、CRC患者の菌叢は増殖異常によって異なるのでなく、発がんの初期段階からCRC特有菌叢があると意味する
* 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する環境を形成すると思われる

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される
* 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であり、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、取り扱う事ができる
* 菌叢と宿主の間の1枚の上皮細胞層は細菌侵襲に対する物理化学的障壁だけでなく、菌叢、宿主と腔内環境とのやり取りのバランス維持も行う
* eubiosisでは生理的、制御された低級炎症が腸壁に起こり、自然免疫系に監視される
* 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を起こさない
* 結腸炎症を制御下におくため、上皮細胞、調節T細胞と間質細胞によってTGF-β,IL-10など抗炎症性サイトカインが分泌され、日和金も基本的な量のTh17を維持するためILを誘引し、腸壁の粘膜にある病原菌から守る
* 免疫系はPRRに基づく免疫記憶を持っており、無害の日和菌と潜在的病原性微生物を見分けできる
* PRRは主に細菌由来表面分子(MAMPやPAMPと呼ばれる細菌LPS,リポタンパク質,原核生物DNA,外来核酸など)を認識する
* TLRはPRRのメジャーなクラスであり、マクロファージと樹状細胞の表面に発現される
* TLRシグナル伝達は炎症性サイトカインの生成によって免疫防御機構を誘引、タイトジャンクションと密着結合強化による障壁機能強化などして、細胞間微生物侵襲を防ぐ
* 損傷したヒトDNAのCpGモチーフやアポトーシス破片(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し、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はもう1つのPRRグループであり、NOD1-14,IpafとNaipを含むグリコタンパク質受容体のスーパーファミリーに属し、食作用や細胞膜微孔から入る病原菌を検出する
* NLRは免疫細胞や結腸細胞のような非免疫細胞の細胞質に存在する
* NLRは細菌細胞壁断片だけでなく、膜の外側の部位のグリカンを暴露する損傷した宿主細胞膜も認識する
* NLRが活性化すると、受容体がシグナルを拡散するように構造変化をし、複数のシグナル経路によって炎症性サイトカインの生成とオートファジーを誘引する
* PRRの変異や障害は粘膜層の薄状化と定常な炎症反応につながり、特にNOD2変異はクローン病、CRCリスク増加、CRC予測悪化に関連される
* 失調は病原種の侵襲と成長を援助し、免疫系と粘膜障壁の恒常性を妨害し、炎症によって透過性が増加し、腸内微生物による連続性の炎症が起きる

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、腫瘍抑制する正常の抗炎症環境はサイトカインと成長因子(IL, TGF-β, TNF, VEGF)を生成する免疫細胞の活性化によって変化される
* PRRが細胞ジャンクションを強化する一方、炎症性サイトカインの働きによって粘膜透過性が増加し、微生物の細胞間パスウェイを開く
* サイトカインと成長因子は炎症を促進させ、細胞分化に悪影響を与え、形成異常細胞の成長、生存を援助する
* 炎症が定常化すれば、炎症シグナルのカスケードによって増殖、血管形成、成長因子分泌の増加、アポトーシス阻害が起こり、がんの発達を援助する
* 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、それによってCRC患者の予測向上につながる
* 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がある
* eubiosisが傷害されると、マクロファージとT細胞由来TGF-β, IL-6, TNFがCD4 T細胞を炎症性Th17細胞に分化させ、病原菌に対する獲得免疫応答を起こすが、長期粘膜炎症ではTh17の存在がCRC発達に関連される
* 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、生存減少につながる
* 特定の日和菌、特に*Clostiridia*と形成異常細胞は腸の粘膜のTh17蓄積や上皮細胞のTh17生成増加を促進し、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に暴露させる
* 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させる
* 一方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に関して良い結果と関連される
* 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ある
* IL-6はSTAT3の活性化と腫瘍振興につながり、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である
* 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である
* 正常ではTGF-βは異常な細胞増殖を阻害するが、腫瘍間質線維が細胞のTGF-βはCRC細胞の増殖と転移能力を促進し、転移細胞が生存しやすくなるため、TGF-β野生成が増加する腫瘍の再発率が高い
* 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であり、炎症細胞を取り込み、血管透過性、分裂促進シグナルを増加させ、上皮細胞の発がん性シグナル経路(Wnt, NF-κB)を活性化させ、成長と生存を制御する
* 上皮細胞にTNF与えるとCISと変異率が上昇し、TNFとがん発達の直接な機構を示し、CRC患者の疾患進行と低い生存は血中TNF量と正相関を示す
* 炎症の病態生理学機構の1つはROS生成と抗酸化防御の不均衡による酸化的負荷がDNA損傷、形成異常、腫瘍促進の環境形成である
* 酸化負荷的がNFκBを誘引し、TNFα, IL-1, IL-6といった炎症性、腫瘍性サイトカインの増加、分裂促進、抗アポトーシスシグナルを通して炎症とがんを関連付ける
* 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守り、増殖を増加させる
* 肥満が殆どの組織におけるNFκB発現を増加させ、2型糖尿病リスクを増加させる
* 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

* 細菌はクオラムセンシング(QS)やナノチューブでやりとりを行い、それが病原性に重要である
* QS阻害とバイオフィルム形成阻害は次世代抗生物質と言われており、腫瘍発生に影響を与えると考えられる
* QSはオートインデューサーと呼ばれる分子の生成、分泌、認識、応答で回っている
* ナノチューブによるやりとりでは負荷を細胞質成分として受取され、同種間という制限がない
* 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
* QSで自分の数を数え、行動を同期させ、一定数以上になったら遺伝子を同時発現させ、毒素分泌する
* 遺伝子発現が増加すると、バイオフィルム形成が始まる
* バイオフィルム形成によって病原菌が広範囲宿主ニッチに生存でき、自然免疫系による死滅を難化させることで厳しい環境での存続を可能にする
* バイオフィルムは多細胞生物の組織に似ており、遺伝子プールを共有することで共同体の全体利益、安全性が向上される
* バイオフィルム形成はランダムでなく、特有な3D 構造を構成し、表面に線毛で吸着し、細胞間基質で細菌同士が結合する
* バイオフィルム形成によって菌の生存率が向上される
* バイオフィルムが超過密になったら細菌が出る
* 結腸では粘膜層の内側にバイオフィルムがあり、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%にバイオフィルムが見られ、右結腸曲付近のバイオフィルムは上皮細胞の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することで免疫系とPRR認識を回避でき、それで新たな領域に侵襲し、体内を全体的、認識されずに循環できる
* 表面抗原のコーティングだけでなく、種によっては遺伝子発現をon/offできる
* また、宿主の免疫応答を変化させたり、酵素や下流炎症性サイトカインへの影響で免疫回避できる
* 細菌はadhesinやリガンド受容体で宿主に付着し、invasinや融合タンパク質で強制的に宿主細胞の中に入り、中に入ったら宿主細胞をtrojan horseのように用いて増殖する
* 免疫系に見つかると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細菌の存在を定義し、それらが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せず、コミュニケーションネットワークとQSから外される(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く、それによって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、発がんへの関与ができる

特定の細菌について

* 失調の種類が多く、特定ながん関連失調パターンはまだないが、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すると思われる
* 矛盾するデータはあるが、CRC患者とコントロールの菌叢に差が見られるという報告が複数あり、全体的に多様性低下と失調がよく見られる
* 特にFirmicutes,Bacteroidesと乳酸菌低下、Fusobacterium,Porphyromonasの増加が見られる
* E. faecalis, E.coli, Fusobacterium nucleatumはWntの分裂促進シグナリング、DNA欠損、DNA回復機構阻害と粘膜透過性の増加などを誘引でき、それらがCRC発がんに重要である
* 実験環境では、プロテオバクテリア、特にLactobacillus、の存在量は腫瘍負荷に対して負の相関を示し、Bacteroidetesとプロテオバクテリアは常に腫瘍の数と負荷を増加させる門に含まれ、優勢であるBacteroidetesとFirmicutes門のバランスと疾患の進行との関係に重要と思われる
* 22菌腫の相対存在量に基づきメタゲノムでのCRC予測は便潜血検査と同等な精度を示し、50%の正解率で10%の偽陽性を示した(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に増量が見られる
* FISH法によって腫瘍組織における増量と侵襲が見られる
* FNがFadAを分泌し、それによって上皮細胞のe-cadherin複合体が機能を果たせなくなり、細胞質のβ-cateninが結合されず、それが増殖異常につながる
* 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倍上昇し、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倍高く、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







