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)

理由

* 論文の読み方と要約の仕方の学習
* 自分の研究の背景や前提知識の学習

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

→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)は一般的に確立した分子経路における長年の変異の蓄積による遺伝子疾患として知られている。散発性CRCは染色体不安定経路(CIS)によって促進し、一方リンチ症(HNPCC)や家族性腺腫性ポリポーシス(FAP)におけるCRCはそれぞれマイクロサテライト不安定経路(MIS)や腺腫性結腸ポリープ症(APC)遺伝子における生殖細胞変異によって促進され、その両方はより若年における浸潤がんにつながる。最近ではMISと非MIS腫瘍を示す鋸歯経路という新たな経路が定義された。

CRC発がんの分子生物経路は詳細に描かれており、その大半は線種・癌腫配列における変異とエピジェネティクス変化の蓄積を示した(腫瘍抑制遺伝子のLOFや発癌遺伝子のGOFが主)。ただし、病原菌が感染するための経路(クオラムセンシング、侵入、バイオフィルム形成)は細胞増殖の制御仕組みを脱線させることができ、前臨床と臨床研究からCRC発がんと腸内菌叢の強い関係を示した。菌叢における変化が直接または間接的に発がんの仕方に影響を与えられる。それは菌の活性が異形成、クローン拡張、腫瘍成長や浸潤がんを促進する遺伝子やエピジェネティクス変化に影響を与えるためである。

腸内菌叢の共生バランスと宿主-菌叢相互作用はヒトの健康に重要である。バランスの失調や腸壁の慢性、潜在的低級炎症はCRC、炎症性腸疾患(IBD)、過敏性腸症候群(IBS)のような胃腸疾患の促進に供与またはきっかけになることがある。また、失調はアテローム硬化症、肥満、2型糖尿病、代謝症候群、精神的混乱のような腸外の全身的疾患にも関与するとされる。

近年では菌叢がCRCの探索的研究の構成に取り組まれており、失調とそれに関連する免疫応答がCRCの発がんを促進し、予測にも関連することが明確である。菌叢は長期的にも安定であるが、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様々な要因によって菌叢の多様性の低下や炎症を起こしやすい状態になりやすくなる。

菌叢の操作(プロバイトティクス、プレバイオティクス、抗生物質など用いて)が腫瘍発生の進行を変化させ、特に去勢や阻止することが可能であるため運び屋菌の候補や発がん性代謝物、腔内減少や炎症経路は集中的に研究される対象となる。

16S rRNAや全ゲノムショットガンシーケンシングのメタゲノム研究がCRCと関連される細菌の多様性の低下と特定な好発がん性細菌(Fusobacteria、*Porphyromonas*など)のより高い確率を示した。

本論文ではCRCと腸内菌叢を関連付ける研究とその意味合いについてレビューする。また、最新の腸内菌叢とCRCの側面性との関係や化学療法への影響についての発見を紹介する。

大腸がん

　CRCは西欧米、北米、オーストラリアやニュージーランドの一般的な悪性腫瘍であり、人口の5-7%が患っている。人口スクリーニング、手術や腫瘍学における進歩にも関わらず、CRCは未だに癌による死亡理由のトップの1つである。生活や食生活の西洋化によって、東洋の国々にもCRCの件数が上昇しており、CRCの全国負荷は60%増加し、2030年では毎年220万の新たな件数及び110万の死亡数が予測される。米国における5年間の生存率は上がったが(ここ40年間において、50%から65%に)、CRCは今でもヘルスケア経済に重い負担をかけている。2013年では118万の米国民がCRCを患い、その普及率が上昇している。

最近原発腫瘍の側面性と右側面性CRC患者の無増悪や全体的な生存の減少への影響が注目を引いている。CRYSTALとFIRE-3研究がbevacuzimabまたはcetuximabと従来な化学療法を受ける764人の転移性CRC(mCRC)のKRAS野生型患者を視察した。右側面性の原発腫瘍の患者の無増悪生存と全体的生存が左側面性原発腫瘍の患者に比べ著しく減少した。

その発見が右や左の側面性原発腫瘍、RAS野生型のmCRC患者1137人(どの患者もbevacuzimabまたはcetuximabと従来な化学療法)の予測研究(CALGB/SWOG 80405)によって確認された。左側面性原発腫瘍のCRC患者の全体的生存の中央値が33.4ヶ月で、それに対して右側面性原発腫瘍のCRC患者の中央値が19.4ヶ月である。それらの研究の予測的解析からの全体的な結論は右側面性CRC患者が、RAS型に関わらず、上皮増殖要因受容体(EGFR)の抗体の恩恵を受けなかったのである。

また、最近の研究ではほとんど全部の右側面性腸の腺腫やがんでは右の腸にバイオフィルム形成が見られ、左側面性がんからはたまにしかバイオフィルム形成が見られる(89%対12%)。ここで重要なのは、組織学的に正常な腸の粘膜、外貨的切除のマージンから集めたもの、もバイオフィルムポジティブやネガティブであり、そのがんと100%一致性を示した。

細菌のバイオフィルムはCRC発がんの初期段階、腺腫が癌腫になる悪性化が起きる前の段階、における自由な運び屋とみなされることができる。CRC進行を促進するバイオフィルムの活性を伝達する工程がいくつか提案された。例えば、結腸クリプトのE-cadherinの低下、腸の透過性の増加、ポリアミン代謝物の生産とそれらのアセチル化、IL-6/STAT3シグナリングの誘導増加である。

CRC発がん-分子経路

ほとんどのCRCに見られた2つの一般的な経路はKRAS, APC, MYC, Wnt, MAPK, p53の変異から進行するCIS経路とMMR遺伝子変異から進行するMIS経路である。ほぼ90%以上のCRCは散発性であり、生殖細胞の変異によるCRCはわずかである。

FAPにおけるCRCは(1%以下のCRC)まれな悪性化であり、原因は染色体5q22におけるAPC遺伝子のフレームシフト変異である。その変異によってstopコドンが現れ、APCタンパク質が短く切られ、β-cateninとe-cadherin複合体の細胞質部分との結合を阻害する。自由な細胞質内β-cateninが細胞核に移動し、Wnt-signallingの増加になる。それで、FAPが複数の腺腫と40歳前のCRCを促す。

Ulcerative colitisの患者の20%が発病30年内にCRCになるため、慢性炎症は発がんにつながるとされる。IBDはCRCの重要なリスク要因の1つとして一般に認められている。116研究のメタ解析からIBD-CRCの診察結果の平均年齢は43歳であり、散発性CRCより10-15年若いが、5年間生存率はほぼ同じである。さらに、NSAIDの長期使用がCRCの生涯リスクを減少させることが確率されたため、炎症と発がんの関連が更に示された。

また、成人早期の長期的抗生物質使用と後の大腸腺腫リスクの増加が関係しているように見えたという発見から、菌叢と細胞の異常増殖の関連を示した。

散発性CRCでは増殖促進の発がん性遺伝子と増殖抑制の腫瘍抑制遺伝子の複数の変異の蓄積にははっきりな遺伝子傾向が見られなかったが、家族特有のクラスタリングが見られた。

正常の大腸粘膜の一定な増殖率は前駆発がん性遺伝子と腫瘍抑制遺伝子の絶妙な平衡の結果である。増殖についての研究から腸のクリプトにおける早い回転率と莫大な細胞分裂のため、毎日万単位の変異が起こることが示された。

MMR、塩基除去修復、ヌクレオチド除去修復、二本鎖切断修復などの効率的なDNA修復機構が常にゲノムに複製エラーがあるのかどうかを操作する。DNA欠落は直ちに修復され、塩基除去修復機構だけで毎日腸の1万の修復を担っている。DNA修復に時間が必要であれば、腫瘍抑制遺伝子、その中にp53が最も重要でよく知られている、によってG1細胞周期が伸ばされもしくは停止される。修復するのに変異が多すぎる、広範囲すぎるであれば、ミトコンドリア機能を停止させる複雑なシグナル経路によってアポトーシスが開始され、即刻の細胞死が起きる。

DNA修復機構が大変効率的であるが、ときに変異が起こり、進化と遺伝子疾患を説明している。生殖細胞由来・遺伝的がん以外では、CRCの進行には大腸がんの発がんのきっかけになるために重要な発がん性遺伝子や腫瘍抑制遺伝子に何十年間の変異の蓄積が必要である。

ある特定の細菌の株が発がんのきっかけになることはまだ証明されていないが、現代の腺腫・癌腫経路の理解は菌叢における変化、失調のような環境的要因、管腔現象を含むのに拡大された。

腸と菌叢

微生物は何十億年も進化しており、ヒト体内の消化管は何兆か(3.5-4 x 1013)の微生物の住処である。その微生物の数はヒト細胞の数(約3 x 1013/70 kg)よりも若干多く、ヒトゲノムに対してそれらの微生物の遺伝子は150倍もある(3300万)と言われる。ヒトの結腸は地球の微生物生態において、最も密度が高いと提唱される。

結腸では、細菌の濃度は1011/g内容物であり、小腸に比べて何万倍高い。小腸の菌叢は大変異なっており、その菌叢が変化しやすく、食生活依存性が見られる。小腸の厳しい化学環境に反し、大腸がんのリスクに対して小腸癌のリスクは12倍低く、発がんに菌叢が何かの役割を果たしている可能性を示した。

腸内菌叢は残留食物、腸管分泌物、消化液、死んだ結腸細胞を代謝する多様な日和微生物からなる生態である。結腸はビタミン生成(ビタミンK,B12,チアミン,riboflavin)、水分吸収、排便のため直方への排泄物運搬をする。タンパク質分解発酵は高いタンパク質摂取に伴い増加し、フェノール化合物、アミン、アンモニア、N-ニトロソ化合物(NOC)とインドールを生成するようになり、それらが上皮細胞の分化と増殖に発がん性影響を与えると考えられている。

結腸代謝は主に発酵による栄養素及び難分解炭水化物(デンプンやタンパク質)からのエネルギーの抽出に関わる。結腸とは私達の1日の必要エネルギーの10%を提供する他、熱も生成するバイオリアクターであり、その熱は微生物のための安定な腔内環境や安定な体温の維持に重要である。微生物は他の生物よりも単位質量あたりの発熱量が高く、安静状態の体熱の70%は腸における細菌代謝によるものと見積もられる。

菌叢とヒト組織は1つの上皮細胞層、粘膜層を代表する、によって分離される。上皮細胞は粘膜層と免疫系によって潜在的病原菌から守られる。この頑丈な障壁に裂け目ができれば、慢性炎症状態を起こす可能性がある。

ヒト結腸では、全体的増殖率は3-100億結腸細胞/日であり、どの哺乳類の器官よりも高い増殖率である。この一定的な増殖にはすぐに利用可能な栄養素とエネルギーが必要であり、それでこの工程は食生活の変化に大変敏感である。それぞれの結腸クリプトの底には遺伝子やエピジェネティクス変異を蓄積しながら4-6個の幹細胞が莫大数の結腸細胞に増殖する。連続的な増殖のため、新たな結腸細胞がクリプトの底から表面に向けて1つ細胞位置/時間で移動する。管腔の表面にたどり着いた結腸細胞は剥離される。クリプト、そして結腸の粘膜層全体、は数日で完全に新装される。

菌叢は広範囲のヒト遺伝子の発現に強い影響を持つ。例えば、*Bifidobacteria*, *Lactobacilli*と*E. coli*の特定な株はムチンの遺伝子発現、マクロファージや樹状細胞のToll様受容体(TLR)、カスパーゼ発現を影響し、免疫活性やアポトーシスを調節する。ただし、共生バランスが整っているとき、日和菌と免疫細胞の相互作用によって炎症遺伝子と前駆発がん性遺伝子、抗炎症遺伝子と腺腫抑制遺伝子の絶妙なバランスを成立させる。腸内菌叢の同定、ほとんどが嫌気性細菌を含む多様な微生物、は何年間も続いているが、菌叢のほとんどは未だに不明である。菌叢の特徴づけへの多分野からの接近から、形態学と分子学の研究に大きな違いがあることを示した。それは腸内の全体的な細菌の多様性を評価するのに複数の技術を用いることが必要である。現在では、500-1000の生物種、7000の株の細菌が日和生物の共同体を構成していると見積もられる。

細菌以外、菌叢には多数のウィルス、原生生物、アキーアと真菌類も含まれる。結腸細菌の99.9%は絶対嫌気である(Bacteroidetes, Bifidobacterium, Fusobacterium, Peptostreptococcus, Atopobium, Eubacterium)。菌叢とヒトの体には共生状態は成り立つが、腸の内腔から周りの組織に移動させれば、殆どの微生物は病原性を示す。病院感染は主にグラム陰性菌によるものであり、E. coliが最も病原性を示し、それに続いてpseudomonas aeruginosa, Klebsiella spp, Enterobacter sppがある。殆どの嫌気感染にBacteroidetesが見つかり、高死亡率を持つ。

結腸では糞便(管腔)の菌叢は腸壁のムチン層の中の菌叢(粘膜、近傍菌叢)とかなり異なる。粘膜菌叢より糞便の菌叢の多様性が高く、そのため大便試料は粘膜菌叢の指標にならない(糞便にある微生物の多くは通り抜けるだけ)。そこで、粘膜層の深いところにある粘着性微生物(上皮細胞に直接・間接的に接近できる)の方が発がん性に重要と考えられる。実際に、ほとんどの粘膜微生物は粘膜層の外側にあり、粘膜層の最深部分にある細菌は僅かである。

菌叢は部分的に宿主の遺伝子によって決定され、個人の生涯において常に変化していく。一般に、菌叢は長期間安定であり、年齢者の菌叢と成人早期の菌叢はかなり異なり、特にFirmicutes門の比率が年をとるに連れて減少する。

66 OTUからなるコアー菌叢は全ヒトの内のほぼ40%に共有されるが、未だに正常(健康)な菌叢について不明である。逆に菌叢の60%は変動的であり、宿主因子の組み合わせによって決定される。各個人に特有な菌叢がある(微生物的指紋)が、健康なヒトの間には同様な細菌系統型の存在量と分布が見られる。

老齢化と年齢によるCD4 T細胞の減少によって、菌叢はより炎症を起こしやすく、多様性が減る状態になり、それらが健康への悪影響や腫瘍発生と関連される。T細胞分化の減少によって免疫系の結腸における腫瘍を促進させる炎症を抑制する能力が低下する。また、菌叢の年齢による変化の内、酪酸生成菌(特にFirmicutes門の)の減少があり、結腸細胞の主なエネルギー源の減少及び結腸内のpH値増加につながる。高いpH値、炎症と失調は結腸細胞にとっての環境悪化と腫瘍発生につながる。

大腸がん発生に関連する特定の細菌株の探索では、保護的で、酪酸を生成するグラム陰性菌と炎症を起こし、ムチンを低下させるグラム陽性という相反する役割が見られる。複数のペーパーが動物やCRC患者におけるCRCの発がんと幾つかの株の関係を視察した。方法、試料と結果は一致していないが、ほとんどの研究に再現されたパターンは乳酸菌の減少、Fusobacteria, Staphylococcaceae, Porphyomonadaceaeの増加が示される。FusobacteriaとPorphyromonoadaceaeは相乗的に口腔がんを促進すると知られている。

1個体からの腫瘍組織やポリープの近くにある菌叢は正常の粘膜層の菌叢と大差がなく、CRC患者の菌叢は腫瘍によって変化するわけではないと示し、発がんの初期段階からCRC特有の菌叢が存在すると示す。

一般に、研究は少量のサンプル数に基づき、コントロールは比較できないであり、現時点では特定のがん関連腸の微生物を特定するのは不可能である。1つの発がん性菌株より、ある特定の菌組成とそれらの代謝物が発がんに関係する環境を建築させ、それが通常/慢性炎症工程や免疫系の変化によって成立させた。

粘膜防御機構と炎症

健康な個体において、大腸の上皮細胞の構成と機能及び免疫系によって宿主と菌叢の相利共生が維持される。バランスの維持は腸の障壁の状態と栄養摂取、ビタミン生成の関与の維持に重要である。健康な菌叢は食物の成分と他の腔内物質を有益、無益、病原性的という分類に分けることができ、それぞれを取り扱う事ができる。

菌叢の宿主の1枚の上皮細胞層は微生物侵入に対する物理的・化学的障壁だけではく、宿主、菌叢と腔内環境間のやり取りを整える役割もある。バランスが整っているとき、生理的で制御される状態の低級炎症が腸壁にあり、それは自然免疫系によって監視される。免疫系が正常、自然にある微生物を認識されるように調教されるため、健康な菌叢は宿主の粘膜に大きな炎症応答を起こさない。

結腸の炎症を抑制するために、TGFβやIL-10のような優勢な抗炎症サイトカインは上皮細胞、制御性T細胞(T regs)と間質細胞によって生成される。基本的な量のヘルパーT細胞(Th17)を維持するのに、日和細菌もILを誘導し、それによって(腸を)腸壁の粘膜にある病原菌から守る。

免疫系には免疫の記録が含まれており、それはパターン認識受容体(PPR)に基づき、その記録が無害の日和菌と潜在的病原性微生物を見分けることができる。PPRは主に微生物由来の表面分子、細菌のリポポリサッカライド(LPS)、リポタンパク質、原核生物DNA、外来核酸など、を認識し、それは微生物関連分子パターン(MAMP)や病原菌関連分子パターン(PAMP)と呼ばれる。