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。

TLRはマクロファージや樹状細胞の膜に発現されるPRRの大きなクラスに属する。TLRのシグナルは免疫防御機構を引き起こし(主に炎症を引き起こすサイトカインを生成することによって)、タイトジャンクションと密着結合の強化によって障壁機能を強化し、細胞と細胞の間を通る微生物の侵入を防ぐ。欠損したヒトDNAのCpG(cytidine-phosphate-guanosine)モチーフとアポトーシスの破片(欠損関連分子パターン(DAMP))は細胞内DNAセンサーであるTLR9を活性化させることができ、それによって自己破壊的、慢性なB細胞免疫応答を引き起こす。慢性的なTLR9の誘引が消化管における腫瘍の成長や拡散(転移)を促進させる可能性がある。

PRRのもう1つのグループはNOD様受容体(NLR)であり、それはグリコタンパク質受容体のスーパーファミリーに属する密接な関係を持つ細胞センサーの大きなファミリーであり、その中(NLRの中に)に細胞膜の微孔や食作用によって細胞内に入るPAMPを検出するNOD1-14, IpafとNaipがある。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は一般的なNLR活性剤である細菌の細胞壁断片だけでなく、細胞質のNLR受容体に膜の外側のグリカンを暴露する破損した宿主の細胞膜にも反応し、認識する。NLRの活性はその受容体の構造の再構成を引き起こし、複数のシグナル経路へのシグナル拡散を成立させ、炎症を引き起こすサイトカインの生成やオートファジー活性を誘引する。

PPRにおける障害や変異は粘膜層が劇的に薄くなることや持続的な炎症反応につながる。特に、NOD2の変異はクローン症、CRCリスクの増加とCRC予測の悪化と関連される。

失調は病原種の侵入と成長を促進し、免疫系と粘膜障壁の恒常性を破壊する。それによる炎症が透過性の増加に繋がり、腸内菌叢が連続的な炎症状態を促すことを可能にする。

炎症と菌叢、発がんとの関連

　菌叢と自然免疫系の調整された機能に病原菌が侵入したら、抗腫瘍免疫を促す正常な抗炎症環境がインターロイキン、TGF-β、腫瘍壊死因子(TNF)と結界内皮細胞成長因子(VEGF)のようなサイトカインや成長因子を分泌する免疫細胞の迅速な活性化によって変化される。

　PPRが細胞のジャンクションを強化することで上皮の障壁機能を保とうとしながら、炎症を引き起こすサイトカインによって逆の効果が生成され、傍接合部リングの細胞骨格短縮によって粘膜の透過性が増加し、微生物に細胞と細胞の間を通る道を開ける。サイトカインと成長因子は両方炎症を促進し、細胞分化に悪影響を与え、形成異常の細胞の成長、生存を助ける。自律的な工程として、腫瘍細胞や微生物そのものがより多量のサイトカインを生成することもある。

　持続的な炎症状態に発展したら、炎症シグナルのカスケードは増殖、血管形成、アポトーシスの阻害、成長因子の分泌上昇に繋がり、それらががんの進行を促進する。

　いくつかのサイトカインがバイオマーカーと治療対象として使用できる。分類制度(Immunoscore)がCRC患者の予測を向上させるかもしれない。再発のない生存と全体的生存を予測するのにImmunoscoreがMISを検査するより有利であることが変量解析によって発見された。

　共生バランスが損なわれるとマクロファージやT細胞から生成されるTGF-β、IL-6とTNFが原始的なCD4 T細胞を炎症を引き起こすTh17への分化を引き起こし、病原菌への獲得免疫応答にたどり着く。持続的な粘膜炎酒の場合、Th17の長期的存在がCRCの発達につながるとされる。CRC組織へのTh17の侵入と分裂促進的なTh17のサイトカイン(特にIL-17とIL-22)の増量が予測の難化と生存の減少に関連される。

　ある種の日和菌(特にClostridia種)や形成異常が腸粘膜におけるTh17の蓄積と上皮細胞のTh17生成を促進させ、Min-mouseモデルでは実験動物を腸内毒素原性のBacteroides fragilis(ETBF)に暴露させ、CRCの重要な促進因子の1つと示される。実験環境ではT regsの枯渇によるTh17制限が微小腫瘍形成を減少させた。一方、CRCにおける無病生存と全体的生存に関していえば、CD3+(それとCD8+かも)への侵入とマークされた腫瘍はよい臨床的結果に関連される。

　IL-6は強力な炎症を引き起こすサイトカインであり、CRC発達に明確に関連し、がん組織の血管形成に重要である。マクロファージ、T細胞や腫瘍維持間質の線維芽細胞から生成されるIL-6はSTAT3の活性化と腫瘍進行につながる。血中内のIL6の増加は腫瘍サイズ、肝臓の腫瘍転移とCRC患者における低い生存の独立な予測マーカーである。

　炎症細胞とマクロファージに生成される他の多機能サイトカインであるTGF-βは細胞成長、分化、アポトーシスに重要な役割を持つ。正常の環境下では上皮細胞におけるTGF-βの活性化は細胞周期チェックポイントと成長停止の誘引によって異常な細胞成長を阻害するが、不活性化変異によるTGF-βのシグナル分子の欠損やTGF-β受容体の変化はCRCにおいて高頻度にある。腫瘍間質の線維芽細胞が生成するTGF-βには逆の効果があり、CRC細胞の増殖と転移能力を促進させる。転移性細胞の生存が有利のため、TGF-βの増加で特定される腫瘍が治療中の高再発生率と関連される。

　マクロファージは強力な炎症を引き起こすサイトカインであるTNFも生成し、炎症細胞を回復させ、血管透過性と分裂促進シグナリングを増加させる。

　TNFは上皮細胞における発がん性シグナリング経路(Wntと核因子K-B(NF-KB))を活性化させ、成長と生存を制御している。上皮細胞のTNFへの暴露はCISと変異確率を増加させ、がん発達に対するTNFによる直接的な機構を示している。血中内のTNF量はCRC患者における疾患の進行と低い生存と正相関を示した。

　炎症の病態生理学の機構の1つに反応的酸素種(ROS)の生成と抗酸化防御機構の不均衡による酸化的付加を含み、それがDNA欠損と形成異常に繋がり、それらが腫瘍を促進する環境につながる。酸化的付加がNFKBを誘引し、それが炎症を引き起こし、腫瘍を促進するサイトカイン(TNFα、IL-1、IL-6)や分裂促進的、抗アポトーシスシグナリングを増加させる能力によってがんと炎症を結びつける。NF-KBは直接に複数の遺伝子(bcl-xとsurvivinを含む)からなる複合体を制御し、増殖を増加させ、腫瘍細胞をアポトーシスから守る。肥満もほとんどの組織におけるNFｋB発現を増加させ、それによって2型糖尿病のリスクも増加する。NFKBは肥満、2型糖尿病、心血管疾患、IBDとがんを関連させる因子であるかもしれない。

宿主免疫系の回避

　腸内細菌は宿主の組織に侵入し、宿主の免疫系を回避し炎症を維持することができる。細菌はクオラムセンシング(QS)という工程に用いられる化学分子やナノチューブによって内部的にやりとりし、その両方が細菌の病原性に重要である。QSの妨害(クオラムクエンチング)方法やバイオフィルム形成の阻害方法が次世代の抗生物質と言われており、腫瘍発生にも影響する可能性があり、それによって今はそれらが集中的に研究されている対象である。QSは自己誘導物質と呼ばれる小さなホルモン様物質による化学的シグナリングの生成、分泌、検出と応答を伴う。

　細菌はナノチューブ(直径30-130 nmの小さなトンネル)も用いて、それに通して細胞質成分(例：耐性)として貨物が受け渡しできる。更に、ナノチューブは同種相互作用に制限されない。細菌の宿主への攻撃が成功するのにタイミングとコミュニケーションが重要である。精密に実行されなければ、細菌は即刻に宿主の免疫系によって死滅される。QSを用いることで、きめ細かく、強力な攻撃が防御機構を乗り越え、宿主を死に至らしめることもある。細菌は自分らを数えたり、自分らの行動を同期させたり、特定の遺伝子を同時に発言させたりするのにQSを用いる。侵入(大群攻撃)を成功させるのに、細菌は自分らの数が限界質量(シグナル分子の上限)を超えるのに待ち、そして同時に自分らの毒素を分泌する。遺伝子発現が増加されると、複数の細菌がエキソポリサッカライドを生成し、病原性と耐性に重要な粘着質防御層(バイオフィルム)として自分らを結合させる。

　細菌は環境の変化を認識し、プランクトンのような浮流生物のままでいるのとバイオフィルム内のより安全な生活をするのとどっちのほうが有利なのかを判断する方法を進化させた。細菌がプランクトン型から共同体型に変更すると、複数の遺伝子の活性の変化に伴う行動の変更が見られる。バイオフィルムの入植が始まると、バイオフィルムは細胞分裂と取り込みの組み合わせによって成長(拡大)する。

　バイオフィルム形成によって病原性細菌が広範囲の宿主ニッチへの入植と厳しい環境での存続が可能になり、(病原菌の)自然免疫系による死滅が難しくなる。多くの場合バイオフィルムがそれぞれの代謝を発達するため、バイオフィルムはより高等な生物の組織と比較されることがあり、その中に共同体の全体的利益と安全性に共同の遺伝子プールが高密度の細胞を有利にさせるのである。

　バイオフィルム形成はランダムな工程でなく、何百万何十億の細菌を含む3次元的構造に発達する特有な構成を持つ。線毛によって表面に付着し、自己生成した重合体の細胞間基質によって細菌同士が結合し、小さな町のような共同体を軽趾壊死、栄養素の流れのためと同時に中にある細菌をバイオフィルムを出入りできるように塔、道、橋やチャンネルのような構造がある。バイオフィルム内に生活すれば、細菌は存続能力と有害な環境因子への耐性の増加によって自分の生存率を向上させる。

　バイオフィルムの超過密が起きたら、コミュニケーション分子は細菌がバイオフィルムから出るように促す。結腸では、バイオフィルムが保護的な粘膜層の内側に発見され、細菌と結腸細胞の直接な相互作用を可能にし、炎症を引き起こす。約15%の健康な個体が薄い細菌バイオフィルムを持っており(主に結腸の右側面に)、ほぼ100%の右側面性CRCでは多量なバイオフィルムが発見される。それに加え、右結腸曲の近傍のバイオフィルムが高頻度な上皮細胞のKRASとBRAF変異を構成し、右側面請願の予測の低下に関連される。

　攻撃が実行されると、細菌は免疫系を回避するために高効率な機構を発達させた。細菌の表面抗原(LPSとペプチドグリカン)を偽装させるために炭水化物のコートをすることによって細菌が偽装でき、免疫の監視とPPR認識を回避できた。細菌が認識されずに新たな領域に侵入でき、体内に認識されずに組織的に循環することもできる。

　宿主内では、細菌は簡単な構造分子を変更させることで、表面分子の発現を変更させ、自分らを変装する。細菌によっては、発現をオン・オフに切り替える遺伝子スイッチを持つものもある。宿主の獲得免疫が以前の高原への暴露の記憶に依存するため、表面抗原の多様性やカバリングは体液性・細胞応答をごまかすのに大変有効である。

　下流の炎症性サイトカインに影響を与えることや免疫グロブリンを劣化させる酵素(IgAプロテアーゼなど)の分泌によって、細菌は宿主の免疫応答を変更もしくは回避することができる。細菌はアドヘシンや受容体リガンドを用いて宿主細胞の表面に付着し、インバシンや融合タンパク質を用いて宿主細胞の中へ強制的に入る。感染された細胞の中で、細菌が正常のアポトーシス機構を阻害し、細胞をTrojan horseのように用いて、感染細胞の中に細菌が増殖する。

　免疫系に発見されると、線毛やナノチューブを用いて免疫細胞に直接細胞毒性物質を注入することで自己防御できる細菌もある。細菌のサイズのため、細菌は完璧な食作用対象であるが、多くの細菌は食作用活性を中和させる作動体の媒介を注入することで食作用を回避する方法を発達した。吸収や死滅を回避する能力は細菌の病原性に重要な役割を果たす。

　マクロファージに囚われると、死滅を回避するのに細菌がいくつかの方法を持つ。(その中の1つ)一般的には食作用細胞-リソソーム融合の妨害や食水解小体における生存を可能にする機構の利用によって食作用細胞から脱出する。ShigellaやListeria種、Rickettsia種の一部は吸収された生物を包囲する液胞膜を効率的に分解するリシンを分泌する。

ドライバー、パッセンジャーとキーストン病原菌

　菌叢が発がんを可能にする機構は発がん性毒素の生成から炎症経路の操作まで至る。ドライバーパッセンジャーモデルでは菌叢にDNAを欠損させ、ゲノム不安定を促進させる特別な病原性を持つ特定の細菌(ETBF, Fusobacteria spp., Porphyromonadaceae)が存在すると定義した。ドライバは逐次的に日和菌(パッセンジャー)に変わり、それらが腫瘍促進や腫瘍抑制性質を持つ、例えば炎症性のStreptococcaceae, Klebsiella, Proteusなど。細菌疹有事、パッセンジャー(バックシートドライバーとも言う)は積極的な役割を持たない。彼らはコミュニケーションネットワークから外され、QSの影響も受けないが、後の段階で活性化されることがある。ナノチューブを用いることで、パッセンジャーが免疫系によって設置されたどの拡散障壁や阻害系をすり抜ける事ができる。

　キーストン病原菌(α病原菌とも呼ばれる)仮設では、細菌種によって存在量に対して影響が不相応に大きい菌がある。よって、存在量の少ない病原菌であるETBF, Fusobacteria, colibactin生成E. coliなどが失調を起こし、透過性を増加させ、粘膜障壁を超えて移動することができ、それらの毒素で慢性炎症、炎症疾患、発がんへ関与すること付の原因になることができる。

特に重要な細菌

失調が様々な形で現れ、一致したがんに関係する特有な失調パータンも多分発見されないが、発がんは細菌の共同体の構造と代謝活性に依存するかもしれない(多細菌シナジー)、すなわち1つの病原性因子、粘膜障壁の障害、長期的炎症でなく、それらの成分の協奏的な働きが関係する。

矛盾しているデータもあるが、CRC患者とコントロールの粘膜と糞便菌叢が著しく異なるという報告が複数ある。

全体として、CRC患者における一般的な発見は細菌多様性の低下と失調である。特に、多くの場合はFirmicutes,Bacteroidesと乳酸菌の著しい低下に伴い、Fusobacteriumや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回復機構阻害と結合分子を不能にすることによる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の比較的多い存在量、は腫瘍負荷と負の相関を示し、一方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る。実際に、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。

2014年で、EMBLが156人のCRC患者とコントロールの糞便試料のメタゲノムシーケンシングを行われた。22菌種(PorphyromonasとFusobacterium含む)の相対存在量をもとに、メタゲノムを用いてCRCの有無を予測した。その結果、一般的なスクリーニング方法である便潜血検査と同じ精度で予測できた。50%のがんが正しく検出され、偽陽性は10%以下である。メタゲノムと便潜血を組み合わせれば、70%のがんが検出できた。メタゲノムによるCRC検出の精度は初期がんと後期がんと変わらなかった。その方法は後に独立した患者と複数の国のコントロール母体によって確認された。

Fusobacterium nucleatum

　Fusobacterium nucleatum(FN)はCRCに関連される嫌気性グラム陰性菌である。16S rRNAとホールゲノムシーケンシングによって健康な個体に比べ、腺腫患者の粘膜やCRC関連粘膜にFNの多量化が見られた。蛍光遺伝子プローブ法(FISH法)によって腫瘍組織におけるFNの過剰量と細菌の侵襲性も示された。

　FNが分泌した固定化アドヘシン(FadA)が上皮細胞のE-cadherinの細胞外ドメインと結合し、粘着複合体が不能にすることで、FNが直接発がんを促進することができる。その結果は病原菌に粘膜下組織への細胞間(細胞と細胞の間)の道を開ける事である。粘着複合体の故障した細胞間部位は自由な細胞質βcateninと結合できず、そのβcateninが細胞核に移動する。そこで、β-cateninがWnt経路に通して分裂促進シグナリングを増加させ、転写因子、Wnt遺伝子、炎症遺伝子の発現増加とCRC細胞の成長の刺激に繋がる。多量のFN入植とMISがよく関連されることから、FadAはDNA回復を損傷させることも考えられる。最高の三分位値のFN数を持つ個体に腫瘍リスクが三倍増加されることが示される。FNの存在と数は腺腫ポリープからCRCへの悪性化に伴い増加する。腺腫や腺癌の患者の結腸組織のFadA量は正常な個体の10-100倍高く、それを診断マーカーとしての可能性は現在探索中である。腺腫や癌腫組織の検査からFadA遺伝子のコピー数の増加を示し、腫瘍組織の高いFN-DNA量はリンパ節転移の増加とCRC患者のより短い生存期間といった結果の悪化に関連される。

　FNはよく腫瘍の微小環境に発見され、FN存在下では浸透性NK細胞の機能が阻害されると見える。NKの細胞毒性はFNに生成されるFap2タンパク質とすべてのヒトNK細胞と一部のT細胞にあるTIGITと呼ばれる阻害的免疫受容体との直接な相互作用によって阻害されると考えられる。最近の研究では腫瘍性がどのようにFNのFap2タンパク質を利用し、TIGITを用いて免疫系の回避し、免疫細胞活性を阻害するのかを証明する。

　APCminマウスではFNがCRCの腫瘍発生を可能にし、典型的なドライバー細菌を代表する。FNは自分で結腸を入植できず、コロニーを確立するのに複数の他菌種との相互作用が必要であり、そのことがpeptostreptococcusとporphyromonasの成長を促進する。またFNは関節リウマチや肝硬変症といった他疾患にも関連される。

腸内毒素原性Bacteroides fragilis

　Bacteroides fragilis(BF)はほとんどのヒトにある一般的な嫌気性日和菌で、菌叢の約1%を占めている。BFの一部はETBFであり、子供における下痢の一般的な原因である。ETBFにはただ1つの病原性因子が認識され、それはETBF毒素(fragilysin)であり、結腸細胞の上皮細胞受容体と結合する20 kDaのZn-依存性金タンパク質分解酵素毒素である。

　ETBF毒素は上皮細胞の構造と機能を急激に変化させ、その中にE-cadherinの分裂があり、それによって粘膜透過性とサイトカイン分泌の増加、Wntシグナリングの増加、NF-KB活性化、細胞増殖とDNA欠損につながる。In vivoとin vitroの実験モデル及び初期的なヒトデータからETBFが結腸の発がんを促進させることを支持している。少量のETBF毒素が40%の健康な成人にあるとされる。ETBFの存続的入植がSTAT3活性化に伴う亜臨床的IL-17優勢大腸炎になるとされる。ETBFとETBF毒素の増量は後期CRCケースの100%に見られる。Minマウス(Apc min/+)では、ETBFの入植してから1っヶ月後、腺腫形成と可視の結腸腫瘍が見られる。よって、ETBFはCRCの最適な細菌ドライバーを代表するとされる。

Eschericia coli

　E. coliはプロテオバクテリアに属する通性嫌気性日和菌であり、結腸では特に多くはないが、培養が簡単である。E. coliにはいくつかの系統グループがあり、その中にB2株は病原性であり、IBDとCRCによく関連される。B2株はpksというゲノムアイランド(水平伝播由来と思われるゲノム部位)を持ち、そのゲノムはポリケチドーペプチド遺伝毒素、colibactin、の生成をコードする。

　Colibactinは結腸細胞の細胞膜を通過でき、細胞核に移動し、DNAseとして二本鎖DNAの解離、細胞周期の停止、不完全なDNAの修復に繋がり、それらが染色体の異常につながる。微小核、染色体異数性、環常染色体と分裂後期のブリッジは感染後21日まで細胞を分裂させ続け、DNA損傷と染色体不安定の発生を示す。感染細胞は高頻度な変異を示し、E. coli B2株の変異原性と変化能力を示す。

　無菌マウスの腸粘膜には少数のIgA生成細胞しかない。IgAは病原菌の除去と毒素中和に重要である。無菌マウスにE. coli B2株やE. faecalisが入植すれば、両方とも炎症に展開するが、E. coli B2株が入植したマウスのみが結腸腫瘍に展開し、colibactinを発がん性細菌代謝物として同定する。

　pksアイランドを持つE. coli B2株はまた1つの完璧なドライバー細菌を代表し、B2株による入植が散発性CRCの発達に関与するかもしれない。B2株とcolibactinはCRC発がんへの細菌の関与の現在最も強力な候補を代表する。

Porphyromonas

　Porphyoromonas(PM)は上皮細胞層の完全性を害し、侵襲と入植を可能にする。宿主細胞に入ったら、PMがミトコンドリアのサイトクロームC分泌の阻害とcaspase 3活性低下によって細胞アポトーシスを阻害する。また、Bcl-2やsurvivinをコードする抗アポトーシス遺伝子の増加、細胞周期を制御するサイクリン、p53やPI3Kの量やリン酸化状態の変更も起きる。さらに、PMはTNFαと一酸化窒素合成酵素の発現を増加すると見える。それらを合わせると、PMの行動は腫瘍が発生しやすい炎症性な環境につながる。

細菌代謝物：短鎖脂肪酸と二次胆汁酸

プロバイオティクスは酪酸、酢酸、プロピオン酸と吉草酸などの短鎖脂肪酸(SCFA)を生成する。SCFAは結腸細胞に燃料を提供し、いくつかの経路、抗アポトーシスBcl-2の低下、procaspaseを活性化caspaseへ変更、ニトロサミンや過酸化水素のような変異原物質への不可逆的結合、細胞周期制御とオートファジー誘引など、で癌や腫瘍を抑制する。炎症は主にIL-2,-6,-10,-12,TNFα,NFKBの阻害で抑制される。プロバイオティクスはタイトジャンクションの維持と組み立て、ムチン生成増加によって粘膜の障壁機能に関与する。

　他の微生物代謝物、例えばSBA、は発がんを促進する。酪酸とSCFAと炎症やCRC発がんとの関連については両方徹底的に調査された。SCFAの有益な効果は表2に示した。細菌の食物繊維分解から、SCFAは複数のルートから宿主の遺伝子発現に影響を与えることができ、宿主の炎症反応も制御でき、例えばヒストン脱アセチル化酵素阻害剤で遺伝子発現に影響を与える。BacteroidetesとFirmicutes門は多量な酢酸とプロピオン酸を生成し、一方Bifidobacteriaeが酪酸の主元である。

　有益SCFAを遊離させる他に、アミノ酸発酵はCRCとIBDに役割を持つとされる有害化学物を生成する。アンモニア、フェノール、p-cresol特定なアミン、硫化水素のような化合物は慢性炎症やDNA損傷によってがんの開始や進行に関係するとされる。酪酸に抗腫瘍発生性質を持ち、例えば結腸上皮細胞におけるIL-8誘引、ナイーブT細胞から調節性T細胞へのT細胞分化の促進、腫瘍発生するILと金属タンパク質分解酵素活性の減少など。

　酪酸生成菌の減少は結腸内のpH値増加につながり、結腸細胞にとっての有害環境を形成させる。盲腸から直腸までpHの増加は左結腸と直腸における腫瘍発生の感受性の増加に関与する。

　1次胆汁酸(PBA)であるコールさんとケノデオキシコール酸は肝細胞においてコレステロールから生成され、それらがタウリンやグリシンと共役結合しミセルの形成に重要な溶解性と不透過性を増加させる。2次胆汁酸(SBA)は主にリトコール酸とデオキシコール酸(DOC)であり、PBAの共役接合の解離(脱水酸基)によって日和菌から生成される大変強力な細菌代謝物である。

　高脂肪食がSBAの形成を増加させ、腸内免疫系の変化に伴い、菌叢の構成と機能の著しい変化を誘引するとされる。結腸細胞を増量されたDOCへ何回か暴露させると、アポトーシス耐性を誘引する。結腸細胞を高濃度なDOCに暴露すると、ROSとRNSの形成を誘引し、SBAの主な発がん性行動はROS、NFKB活性化と直接なDNA損傷である。