日米の消化器癌臨床検体を用いたmicrobiota解析と分子異常・免疫応答・人種差との関連

札幌医科大学医学部 消化器内科学講座
研究生　菅野 伸一

（共同研究者）
札幌医科大学医学部 消化器内科学講座　講師　能正 勝彦
ダナファーバー癌研究所（米国）　教授　荻野 周史

はじめに

近年、網羅的遺伝子解析技術の進歩によりヒトの体内に膨大に存在するmicrobiome（生物環境を構成する微生物群ゲノムの総称）と各疾患の関連についての研究が急速に発展している。ヒトの腸管内には100兆にものぼる微生物が存在し、腸内細菌叢を形成している。この細菌叢の異常が炎症のみならず、代謝、免疫そして発癌にも重要な役割を担っていることが明らかになってきており注目を集めている。よってわが国の大腸癌増加の原因として腸内常在微生物の変化が関与している可能性も考えられる。

Fusobacterium属は、ヒトの口腔や消化管の腸内常在細菌群の一つであり、これまでの研究では大腸癌でFusobacteriumが存在することは現象であり、単に腫瘍発生のプロセスで引き起こされる局所の変化に過ぎないと考えられていた。しかしながら最近の研究ではFusobacteriumのような正常腸内常在微生物の一部は大腸腫瘍発生に関与する可能性があるという新たな知見が報告され、注目されている[(1)]。

大腸癌は発生部位によってメチル化プロファイルが異なることが明らかにされており、直腸から盲腸に向かうに従い、Microsatellite（MSI）陽性、BRAF遺伝子変異の頻度が連続的に上昇することが報告されている。このような大腸癌の発生部位によるゲノム・エピゲノム異常の違いは、腸内容物や腸内微生物、そして、それらにより引き起こされる炎症や免疫反応が関与していると考えられている。また最近ではFusobacterium属の一つであるFusobacterium nucleatum（F. nucleatum）が大腸癌で炎症を惹起し、MLH1の高メチル化を引き起こすことも報告されている[(2)]。これらの研究成果は、MSI陽性大腸癌の発生にF. nucleatumが関わっている可能性を示しており、大腸癌においてF. nucleatumがpathogenicな役割を果たすだけでなく、そのエピゲノム異常にも大きく関係していることを示唆している。また高レベルのF. nucleatumは癌部だけでなく、その患者の正常粘膜でも検出されることも報告されており、F. nucleatumは大腸癌のリスクを予測するバイオマーカーになる可能性がある。

このようにF. nucleatumを標的とした治療戦略は、MSI陽性大腸癌のような特殊な

phenotypeの早期発見や除菌による癌予防など、将来的な臨床応用が期待される。

最近、癌免疫治療において免疫チェックポイント阻害薬が登場し、T細胞に発現するPD-1とそのリガンドであるPD-L1やPD-L2の結合を阻害することで抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。大腸癌においてはMSI陽性大腸癌でこの阻害薬の抗腫瘍効果が期待できることが、最近の報告で明らかになりつつある。一方、腸内常在微生物であるFusobacteriumが大腸癌の癌部で発現亢進し、発癌との関連性があるだけでなく、PD-L1などのリガンドを発現させることで、T細胞による免疫応答を抑制し、大腸癌の浸潤・転移を促進させる可能性も報告されている[3]。

結　果

そこで我々はFusobacteriumとMSI status、T細胞リンパ球の腫瘍組織内浸潤との関連について多症例の大腸癌臨床検体を用いた検討を行った。対象は日本人（511例）と米国白人（598例）の大腸癌1,109症例でF. nucleatumの発現を解析し、臨床病理学的因子に加え、ゲノム・エピゲノム異常との相関についても検討。またImage analyzerを用いて腫瘍組織内へ浸潤した特異的なリンパ球（CD3+、CD8+、CD45RO+、FOXP3+ T細胞）の密度を自動カウントし、F. nucleatumとの関連についても解析を行った。その結果、大腸癌症例の13%（米国人）、9%（日本人）でF. nucleatumは陽性であった[3、4]。MSI陽性は米国人大腸癌の16%、日本人大腸癌の8%で認められた（図1）。

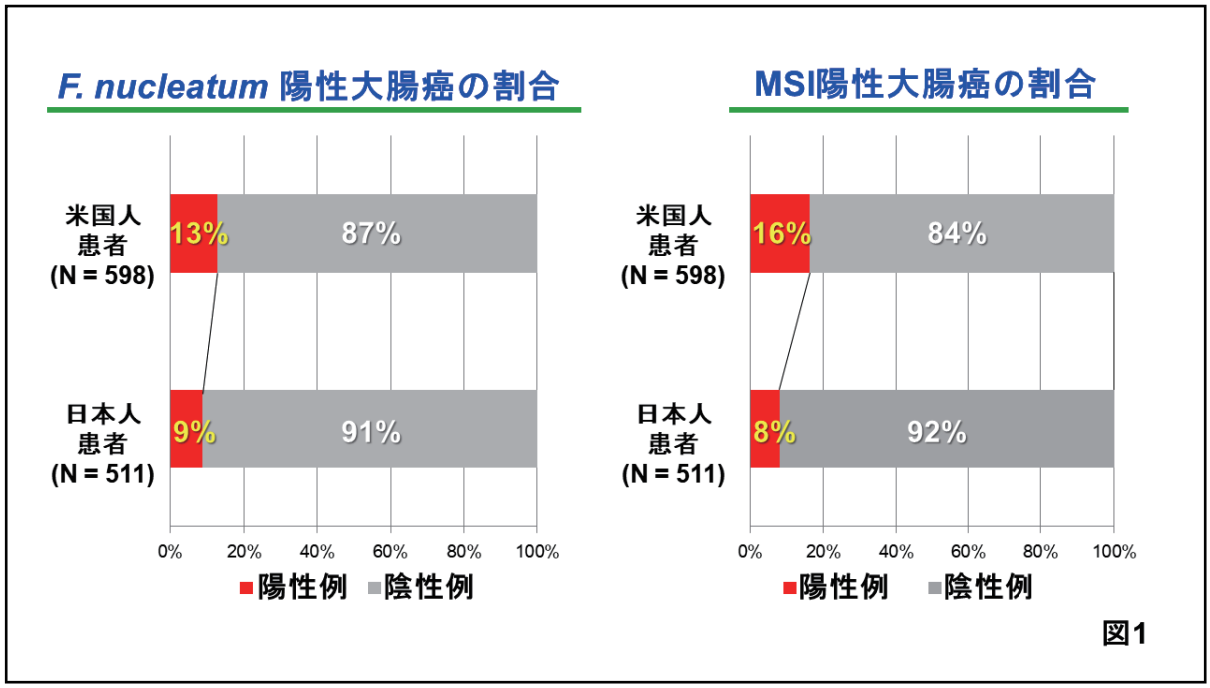
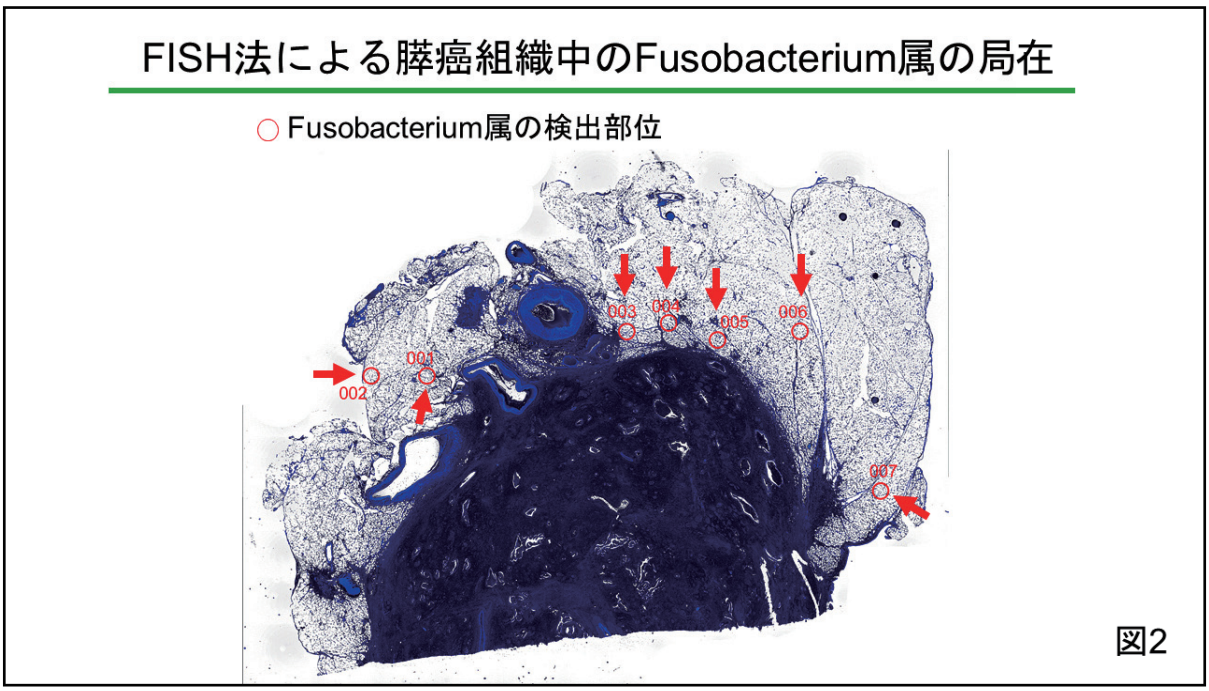


図1

また人種に関わらずF. nucleatum陽性例はMSI陽性と有意な正の相関を認めた。臨床病理学的・分子生物学的因子を変数として加えた多変量解析ではF. nucleatum陽性大腸癌の

群は陰性群と比較して腫瘍組織内のCD3+T細胞の密度が有意に少ないことも明らかとなった[3]。

その他の消化器癌においても解析を行ったところ胃癌の38%（78/208）、膵癌の9%（25/283）、胆管癌の15%（29/50）でそれぞれFusobacterium属は同定された。膵癌組織でのFusobacterium属の報告は皆無であったため、その存在部位を明らかにするためにFISH法を施行。その結果、Fusobacterium属は膵癌組織の近傍の脂肪組織に認められることが明らかとなった（図2）。



膵癌の分子異常に関する検討ではKRAS変異陽性は膵癌の68%、MSIは0%、CpG island methylator phenotype（CIMP）陽性は12%、miR-21高発現は40%、miR-31高発現は32%で認められたが、いずれもFusobacterium属との相関はなかった。一方、Fusobacterium属の陽性群は不良な予後と有意な相関を示した（hazard ratio: 2.20; 95% confidence interval: 1.13–3.98; P = 0.025）[7]。

考　察

これまでの検討でも日本人のMSI陽性大腸癌の頻度が欧米人よりも低いとの報告が多いが、これらの解析結果は人種や地域差による大腸癌組織内のF. nucleatum陽性率や発現量の違いがMSI陽性の頻度に影響を与えている可能性も示唆している。よって、人種や地域差に関わらず腸内の常在微生物であるF. nucleatumとマイクロサテライト不安定性との間に有意な相関がみられたことは、散発性のMSI陽性大腸癌の発生メカニズムを明らかにする上で興味深い研究成果であると思われる。

また我々は最近、大腸癌細胞のPD-L1の発現量がMSI陽性やFOXP3+T細胞密度と有意に逆相関を示すこと[5]。更には、アスピリンの内服は腫瘍内リンパ球浸潤の少ない大腸癌でのみ生命予後を延長する可能性も報告している[6]。癌免疫治療は大腸癌において今後も注目される分野であることから、特定の腸内常在微生物が引き起こすエピゲノムの異常や腫瘍免疫応答について更なる解明が期待される。

今回の検討でFusobacterium属は、膵癌組織周囲の脂肪組織内に存在することが明らかとなった。また、その陽性群は不良な生命予後との相関が認められたことからFusobacterium属が膵癌の生物学的悪性度に関与する可能性も示唆された。このように多症例の消化器癌を用いてゲノム解析で同定された微生物種とその分子異常、更に環境因子との関連を検討することは、将来的に膵癌の新たな予防法や診断・治療法に繋がる可能性があり、消化器癌の新たな治療戦略を世界に先駆けて報告できるものと思われる。よって、膵癌におけるmicrobiome解析の更なる発展が期待される。

要　約

1）人種に関わらずF. nucleatum陽性大腸癌は、マイクロサテライト不安定性（MSI）の頻度と有意な正の相関を認めた。

2）また、大腸癌組織内のF. nucleatum陽性率や発現量の違いが、日米におけるMSI陽性大腸癌の頻度に影響を与えている可能性が示唆された。

文　献

1. Giannakis M, Mu XJ, Shukla SA, Qian ZR, Cohen O, Nishihara R, Bahl S, Cao Y, Amin-Mansour A, Yamauchi M, Sukawa Y, Stewart C, Rosenberg M, Mima K, Inamura K, **Nosho K**, Nowak JA, Lawrence MS, Giovannucci EL, Chan AT, Ng K, Meyerhardt JA, Van Allen EM, Getz G, Gabriel SB, Lander ES, Wu CJ, Fuchs CS, **Ogino S**, Garraway LA. Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma. Cell Rep S2211-1247:30364 – 3:2016
2. Ito M, **Kanno S**, **Nosho K**, Sukawa Y, Mitsuhashi K, Kurihara H, Igarashi H, Takahashi T, Tachibana M, Takahashi H, Yoshii S, Takenouchi T, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of Fusobacterium nucleatum with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. Int J Cancer 137:1258 – 68:2015
3. Mima K, Sukawa Y, Nishihara R, Qian ZR, Yamauchi M, Inamura K, Kim SA, Masuda A, Nowak JA, **Nosho K**, Kostic AD, Giannakis M, Watanabe H, Bullman S, Milner DA, Harris CC, Giovannucci E, Garraway LA, Freeman GJ, Dranoff G, Chan AT, Garrett WS, Huttenhower C, Fuchs CS, **Ogino S**. Fusobacterium nucleatum and T-cells in colorectal carcinoma. JAMA Oncol 1:653 – 61:2015
4. **Nosho K**, Sukawa Y, Adachi Y, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, **Kanno S**, Yamamoto I, Ishigami

K, Igarashi H, Maruyama R, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of Fusobacterium nucleatum with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. World J Gastroenterol 22:557 – 66:2016

5. Masugi Y, Nishihara R, Yang J, Mima K, Silva A, Shi Y, Inamura K, Cao Y, Song M, Nowak JA, Liao X, **Nosho K**, Chan AT, Giannakis M, Bass AJ, Hodi FS, Freeman GJ, Rodig S, Fuchs CS, Qian ZR, **Ogino S**. Tumour CD274（PD-L1）expression and T cells in colorectal cancer. Gut 66:1463 – 73: 2017
6. Cao Y, Nishihara R, Qian ZR, Song M, Mima K, Inamura K, Nowak JA, Drew DA, Lochhead P, **Nosho K**, Morikawa T, Zhang X, Wu K, Wang M, Garrett WS, Giovannucci EL, Fuchs CS, Chan AT, **Ogino S**. Regular Aspirin Use Associates With Lower Risk of Colorectal Cancers With Low Numbers of Tumor-Infiltrating Lymphocytes. Gastroenterology 15:879 – 92:2016
7. Mitsuhashi K, **Nosho K**, Sukawa Y, Matsunaga Y, Ito M, Kurihara H, **Kanno S**, Igarashi H, Naito T, Adachi Y, Tachibana M, Tanuma T, Maguchi H, Shinohara T, Hasegawa T, Imamura M, Kimura Y, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of Fusobacterium species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis. Oncotarget 6:7209 – 20:2015