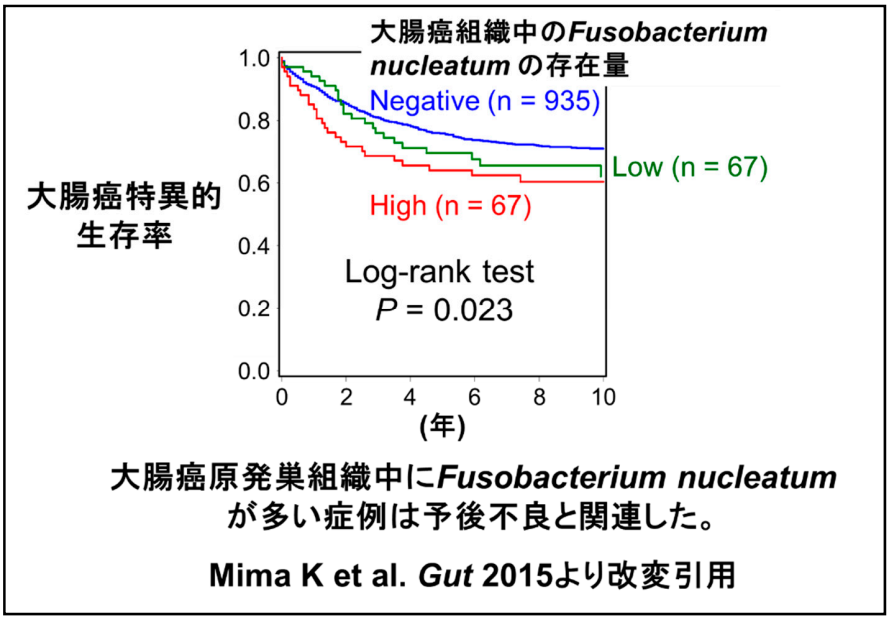
182　腸内細菌を標的とした新しい大腸癌治療法の開発	美馬　浩介

【目的】本邦において大腸癌の罹患数および死亡数は増加している。最新の研究で腸内細菌が抗腫瘍免疫応答を抑制し大腸癌の発育を促進することが示唆されている。しかし、細菌や細菌叢の変化が大腸癌による死亡の主な原因である遠隔転移や化学療法の感受性に関与するかは不明である。大腸癌術後の縫合不全は重大な合併症の 1 つで、患者の quality of life の低下、入院期間延長、予後不良と関連することが報告されている。

【方法】大腸癌原発巣および転移巣の切除標本から DNA を抽出し、大腸癌と関連することが示唆されている *Fusobacterium nucleatum*、*Escherichia coli*、*Bacteroides fragilis*、*Enterococcus faecalis*、*Bifidobacterium* の存在量を quantitative polymerase chain reaction 法を用いて測定した。

【結果】大腸癌転移巣において *Fusobacterium nucleatum* が検出された症例は転移巣切除後の予後不良と関連した（P= 0.031）。大腸癌原発巣組織中に *Bifidobacterium* genus（P = 0.009）が検出された症例では縫合不全発生率が有意に高かった。

大腸癌原発巣組織中の *Fusobacterium nucleatum* と予後との関係



182. 腸内細菌を標的とした新しい大腸癌治療法の開発

美馬　浩介

*熊本大学 医学部附属病院 消化器外科

Key words：大腸癌，肝転移，腸内細菌，縫合不全，*Fusobacterium nucleatum*

緒　言

本邦において大腸癌罹患数および死亡数は著しく増加している。最新の研究で食生活や生活習慣により腸内細菌の構成が変化すること、細菌が抗腫瘍免疫応答を抑制し大腸癌の発生・進展を促進することが示唆されている［1]。我々はヒト大腸癌原発巣組織中の *Fusobacterium nucleatum* と癌組織中の低い T 細胞浸潤密度、低分化腺癌、不良な予後との関連、さらに大腸癌細胞における免疫チェックポイント分子 PD-L1 の発現と癌組織中の FOXP3 陽性 T 細胞の関連を見出した［2，3]。大腸癌に関連した死亡の主な原因は遠隔転移であり、大腸癌の遠隔転移および再発形式として最も頻度が高い臓器が肝臓である。肝臓は門脈と肝動脈からの血流を介して細菌にさらされ、T 細胞、マクロファージなど多くの免疫細胞が存在する［4]。大腸癌肝転移巣組織中に多くの T 細胞が浸潤している症例は抗癌剤の感受性が高く、予後良好である[5]。さらに最新の研究で、非癌部の肝臓組織に比べて大腸癌肝転移巣に *Fusobacterium nucleatum* が多く存在することが示された［6]。

近年、従来の外科治療、薬物療法、放射線療法に加え、免疫チェックポイント分子 PD-1/PD-L1 に対する阻害剤が新たな癌の治療法として期待されている。しかし、抗癌剤・分子標的薬、免疫療法はすべての症例に有効であるわけではない。最新の研究で、腸内細菌が抗癌剤・分子標的薬、免疫チェックポイント阻害剤の効果や副作用に影響を及ぼすことが示唆されている ［7]。マウスモデルではヒトにおける複雑な腸内細菌と免疫細胞との関係を完全に再現できない可能性が考えられるため、臨床応用のためにはヒト大腸癌組織を用いた解析が不可欠である。

大腸癌術後の縫合不全は重大な合併症の 1 つで、患者の quality of life の低下、入院期間延長、予後不良と関連することが報告されている。最新の研究で食生活や生活習慣により腸内細菌が変化し、細菌が大腸癌の発育進展を促進することが明らかになっている。さらにマウスモデルの研究で細菌が消化管吻合部の創傷治癒を阻害することが示唆されている［8]。

以上の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究では大腸癌の肝転移形成や大腸癌の薬剤感受性に関わる新たな細菌の同定とそのメカニズムを解明し、腸内細菌を標的とした大腸癌の新しい治療法や薬剤感受性および副作用を予測するバイオマーカーの開発につなげるための研究を行った。

方　法

1. 大腸癌原発巣および転移巣組織中の腸内細菌の測定

熊本大学消化器外科において切除した大腸癌原発巣および肝転移巣組織から DNA を抽出し、大腸癌と関連することが示唆されている *Fusobacterium nucleatum*、*Escherichia coli*、*Bacteroides fragilis*、*Enterococcus faecalis*、*Bifidobacterium* の存在量を quantitative polymerase chain reaction 法を用いて測定した。

2. 縫合不全の定義

縫合不全は過去の臨床試験の報告に準じて、ドレーンからの腸液排出、注腸造影における瘻孔の証明、瘻孔が証明されなくても吻合部周囲に膿瘍形成を伴うものと定義した。

*現在の所属：国立病院機構 熊本医療センター外科

結　果

1. 大腸癌肝転移巣と腸内細菌

大腸癌肝転移巣 84 例中、9 例（11%）で *Fusobacterium nucleatum* が quantitative PCR により検出された。大腸癌肝転移巣組織中に *Fusobacterium nucleatum* が検出された症例は大腸癌肝転移切除後の予後不良と有意（$P = 0.031$）に関連していた（図 1）。

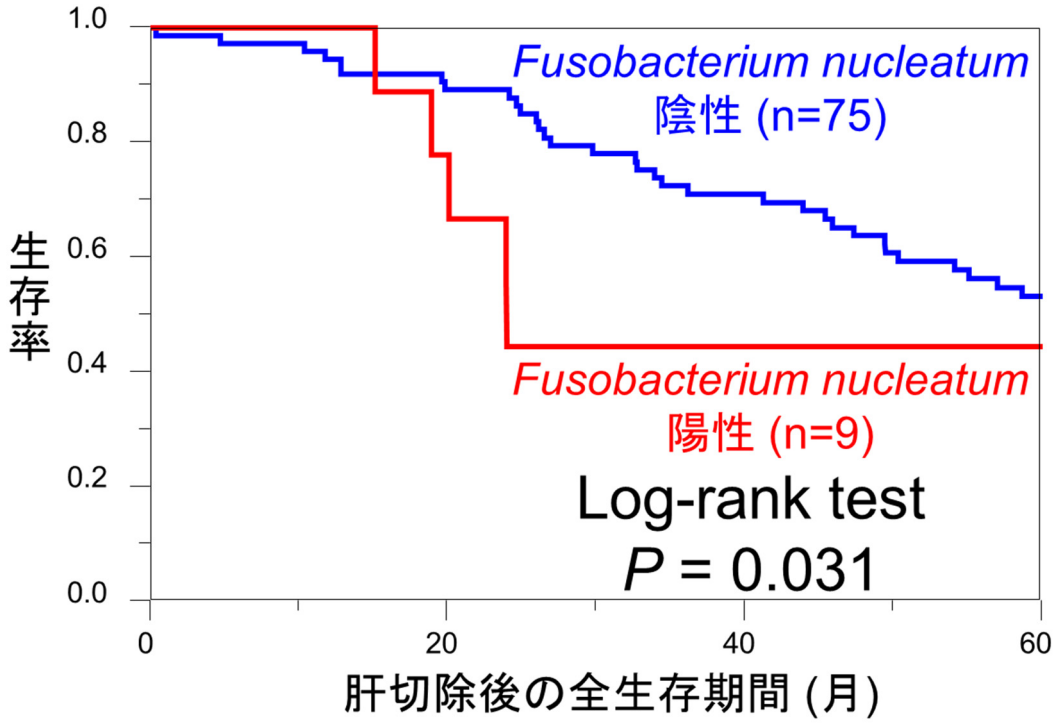


図 1. 大腸癌肝転移組織中の *Fusobacterium nucleatum* の存在と転移巣切除後の全生存率

2. 大腸癌原発巣と腸内細菌

熊本大学消化器外科において 2008 年から 2016 年まで結腸直腸癌に対して消化管吻合を伴う切除を行い、細菌の測定が可能であった 256 例を解析した。消化管吻合を伴わないハルトマン手術、直腸切断術、骨盤内臓全摘術を施行した症例は除外した。解析した大腸癌 256 例中、29 例（11%）に縫合不全を認めた。大腸癌組織および腫瘍から離れた大腸粘膜の凍結組織から DNA を抽出し、これまで大腸癌との関連が報告されている細菌の存在量を quantitative polymerase chain reaction 法で測定し、腸内細菌が検出された症例を中央値で low と high に分類した。

大腸組織中の細菌と縫合不全の関連について解析すると、*Fusobacterium nucleatum*、*Escherichia coli*、*Bacteroides fragilis*、*Enterococcus faecalis* は縫合不全と関連を認めなかったが、大腸癌組織および周囲正常粘膜中の *Bifidobacterium* の存在量が縫合不全発生に有意（$P = 0.009$）に関連した（図 2）。

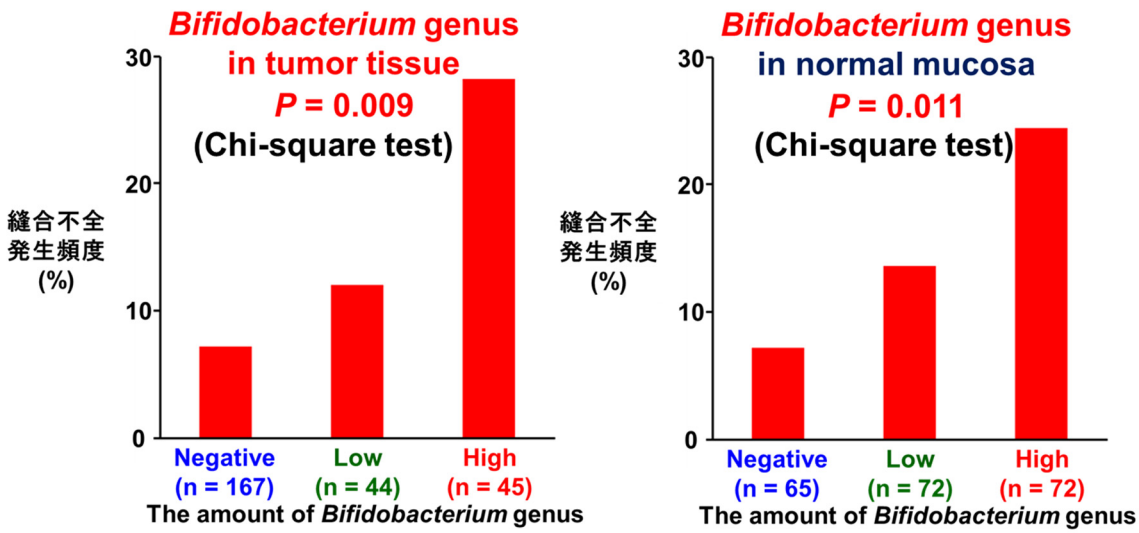


図 2. 大腸癌原発巣組織中の Bifidobacterium genus の存在と大腸癌原発巣切除後の縫合不全発生率
細菌が検出された症例を中央値で low と high に分類した。

患者因子、腫瘍因子、手術因子を含めた多変量解析で、男性（odds ratio［OR］: 6.32、95% confidence interval［CI］: 2.15 to 24.0）、直腸癌（OR : 5.75、95% CI : 2.31 to 14.6）に加え、大腸癌原発巣組織中の *Bifidobacterium* 陽性（OR : 3.20、95% CI : 1.37 to 7.76）が縫合不全発生の独立したリスク因子として抽出された（表 1）。

表 1. ロジスティック回帰分析を用いた大腸癌切除後の縫合不全発生のリスク因子

Model for the incidence of anastomotic leakage	Multivariable OR (95% CI)*	*P* value
Sex		
Men (vs. Women)	6.32 (2.15-24.0)	< 0.001
Tumor location		
Rectum (vs. Colon)	5.75 (2.31-14.6)	< 0.001
Surgical approach		
Open (vs. laparoscopy)	3.18 (1.27-8.02)	0.014
***Bifidobacterium* genus in tumor tissue**		
Positive (vs. Negative)	**3.20 (1.37-7.76)**	**0.007**

考　察

本研究において大腸癌肝転移巣に *Fusobacterium nucleatum* が存在する症例は、肝転移巣切除後の全生存率が有意に不良であった。大腸癌原発巣において *Fusobacterium nucleatum* の存在は癌組織中の低いT細胞浸潤密度、予後不良と関連しており［2, 3］、*Fusobacterium nucleatum* が抗腫瘍免疫応答の抑制し、大腸癌の肝転移形成に関与している可能性がある。今後、大腸癌肝転移巣に浸潤するCD8陽性T細胞数との関連を解析する予定である。

大腸癌切除後の縫合不全の発生と大腸組織中の腸内細菌に関連を認めた。ヒト糞便中における *Bifidobacterium* の減少は抗菌薬起因性下痢、炎症性腸疾患、大腸腫瘍と関連し、プロバイオティクスとして発癌予防、感染症制御、腸炎の軽減などの有用性が実験動物モデルにおいて示されている。しかし、大腸組織中と糞便中の腸内細菌の構成は異なることが報告されており、大腸癌患者や潰瘍性大腸炎患者の大腸組織中には *Bifidobacterium* が増加していることが報告されている。今後さらなる研究が必要であるが、腸内細菌を標的とした大腸癌切除後の縫合不全予防につながる可能性がある。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜わりました熊本大学大学院生命科学研究部消化器外科学の馬場秀夫教授に謹んで厚く御礼申し上げます。本研究の共同研究者は、熊本大学国際先端医学研究機構の石本崇胤客員准教授、Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School の Professor Shuji Ogino である。

文　献

1) Garrett WS. Cancer and the microbiota. Science. 2015;348(6230):80-86. DOI: 10.1126/science.aaa4972.
2) Mima K, Sukawa Y, Nishihara R, et al. Fusobacterium nucleatum and T Cells in Colorectal Carcinoma. JAMA Oncol. 2015;1(5):653-661. DOI: 10.1001/jamaoncol.2015.1377.
3) Mima K, Nishihara R, Qian ZR, et al. Fusobacterium nucleatum in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. Gut. 2016;65(12):1973-1980. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310101.
4) Szabo G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease. Gastroenterology. 2015;148(1):30-36. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.10.042.
5) Halama N, Michel S, Kloor M, et al. Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. Cancer Res. 2011;71(17):5670-5677. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0268.
6) Abed J, Emgard JE, Zamir G, et al. Fap2 Mediates Fusobacterium nucleatum Colorectal Adenocarcinoma Enrichment by Binding to Tumor-Expressed Gal-GalNAc. Cell Host Microbe. 2016;20(2):215-225. DOI: 10.1016/j.chom.2016.07.006.
7) Sivan A, Corrales L, Hubert N, et al. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. Science. 2015;350(6264):1084-1089. DOI: 10.1126/science.aac4255.
8) Shogan BD, Belogortseva N, Luong PM, et al. Collagen degradation and MMP9 activation by Enterococcus faecalis contribute to intestinal anastomotic leak. Sci Transl Med. 2015;7(286):286ra268. DOI: 10.1126/scitranslmed.3010658.