

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02694

研究課題名（和文）革新的治療法開発を目指した抗癌剤耐性に関わる腸内細菌叢の網羅的探索

研究課題名（英文）Fusobacterium nucleatum Confers Chemoresistance by Modulating Autophagy in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

研究代表者

馬場 秀夫（BABA, Hideo）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・教授

研究者番号：20240905

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：Fusobacteriumは歯周病の原因菌として知られているが、大腸癌の発癌・浸潤へ関与する。そこで、食道癌におけるFusobacteriumと抗癌剤感受性との関係を検討した。Fusobacterium陽性例では有意に抗癌剤に抵抗性であった。癌細胞株共培養実験において、Fusobacteriumが癌細胞内へ侵入する様子を電子顕微鏡でとらえることができた。また、それらの細胞ではautophagosomeが観察され、autophagyが誘導された。抗癌剤の添加実験で、Fusobacterium nucleatumがautophagyの誘導を介して、抗癌剤抵抗性に寄与していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌叢はプロバイオティクス（Probiotics；人体に有益な腸内細菌叢ならびにこれらを含む食品・製品）やプレバイオティクス（Prebiotics；腸内細菌叢のバランスを改善する作用がある物質）により後天的に変化させることができる。今後の研究において、消化器癌進展におけるFusobacterium nucleatumの役割がより詳細に解明されれば、がん治療の新たな創薬に繋がる可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：Fusobacterium nucleatum (F. nucleatum) is a gut microbe implicated in gastrointestinal tumorigenesis. The present study investigate the relationship between F. nucleatum and chemotherapeutic resistance in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). ESCC patients with F. nucleatum infection displayed lesser chemotherapeutic response. The infiltration and subsistence of F. nucleatum in the ESCC cells were observed by transmission electron microscopy and laser scanning confocal microscopy. We also observed that F. nucleatum modulates the endogenous LC3 and ATG7 expression, as well as autophagosome formation to induce chemoresistance against 5-FU, CDDP, and Docetaxel. ATG7 knock down resulted in reversal of F. nucleatum-induced chemoresistance. F. nucleatum confers chemoresistance to ESCC cells by modulating autophagy.

研究分野：外科腫瘍学、腫瘍免疫学、腸内細菌、エピジェネティクス

キーワード：腸内細菌 食道癌 抗癌剤 Fusobacterium nucleatum

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌と microbiome

Microbiome とは人体に生存する微生物群とその遺伝子および代謝活性の総称である。Microbiome は、近年、癌、肥満、炎症性腸疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患など様々な疾患との関連が報告され、注目を集めている先端性の高い分野である。多くの環境因子、遺伝的因子、エピジェネティックな因子によって調節・変更され、その人の特有な細菌状態が形成される。Microbiome の多様性は、体の部位、個人間、年齢、食事などによっても変化し、また時間的にも変化する。Fusobacterium は主に口腔内に生息する microbiome の一種で、歯周病の原因菌として知られているが、大腸癌の発癌・浸潤へ関与することが示されていた。我々は、食道癌 325 症例の Fusobacterium nucleatum (F. nucleatum) の DNA 量を定量リアルタイム PCR 法にて測定し、F. nucleatum 陽性症例が有意に予後不良であることを明らかにした。(Yamamura K, Baba H et al. Clin Cancer Res 2016)。このことから、食道癌の発癌・浸潤過程においても、microbiome が重要な働きをしていることを実証された。

(2) 食道癌と免疫チェックポイント阻害薬

手術、化学療法、放射線療法、化学放射線療法などを含む集学的治療の発達にも関わらず、食道扁平上皮癌の予後は未だに不良である。そのため、基礎研究及び臨床研究により、分子標的療法に代表される革新的な治療法の開発が模索されている。癌における microbiome は癌治療・癌化学予防の target として非常に有望である。さらに、抗癌剤感受性・予後と関連する microbiome を同定することは、リスクに応じた治療方針決定に役立ち、また、その変化を標的とした治療法が開発された際には、対象患者選別のマーカーとして用いられることが期待される。さらに、近年注目されている免疫チェックポイント阻害薬が食道癌に対しても有効であることが示され、近い将来臨床の現場で使用されるようになるであろう。大腸癌において microbiome が抗癌剤耐性、腫瘍局所免疫に影響を及ぼすことは報告されているが、食道癌の抗癌剤耐性・感受性、腫瘍免疫と microbiome に関して網羅的に解析した研究は皆無である。

(3) Microbiome と抗癌剤・免疫チェックポイント阻害薬の治療効果

我々は、Microbiome (腸内細菌叢) が食道癌の抗癌剤耐性、腫瘍局所免疫応答に影響を及ぼし、抗癌剤や免疫チェックポイント阻害薬の効果予測のバイオマーカーになりうるという仮説を立てている。近年、Fusobacterium nucleatum が大腸癌細胞の Toll 様受容体 (TLR4) とマイクロ RNA (miRNA-18a と miRNA-4802) を調節し、オートファジーを促進することによって、抗がん剤 (オキサリプラチンあるいは 5-フルオロウラシル) によるアポトーシス (細胞死) を阻害することが報告された (Yu T et al. Cell 2017)。しかし、食道癌の microbiome と抗癌剤感受性に関する研究は皆無であり、本研究は極めて独創的である。

2. 研究の目的

500 例以上の食道癌データバンクを用いて、食道癌における Microbiome (ヒト微生物叢) と抗癌剤感受性、腫瘍免疫動態の関連を網羅的に解析し、抗癌剤や免疫チェックポイント阻害薬に関わる革新的な biomarker を開発することが本研究の目的である。さらに、食道癌関連 microbiome (Fusobacterium nucleatum 等) を用いた機能解析により、食道癌の抗癌剤耐性、浸潤・転移への影響とそのメカニズム解明を目指し、microbiome をターゲットとした創薬のためのシーズを探索する。

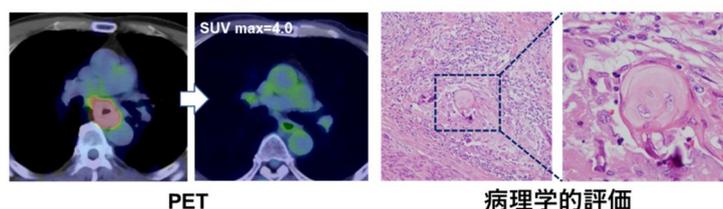
3. 研究の方法

われわれのこれまでの研究より、腸内細菌の中でも Fusobacterium nucleatum が食道癌の悪性度と関連することが明らかになったため、Fusobacterium nucleatum と抗癌剤感受性の関連に Focus を絞って検証することとした。

4. 研究成果

食道癌データベースを用いて、Fusobacterium nucleatum と抗癌剤感受性との関係性を評価したところ、Fusobacterium nucleatum 陽性例では有意に抗癌剤 (5-FU, CDDP) に抵抗性であることが明らかになった。抗がん剤治療効果については、RECIST、治療前後での SUV max 変化、tumor regression grade で行った (図 1)。

図 1



次に、Fusobacterium nucleatum と癌細胞株共培養の条件設定を行った。興味深いことに、Fusobacterium nucleatum が癌細胞内へ侵入する様子を電子顕微鏡でとらえることができた(図2)。また、それらの細胞では特異的に autophagosome が観察され、autophagy が誘導されていることが示唆された(図3)。

図2

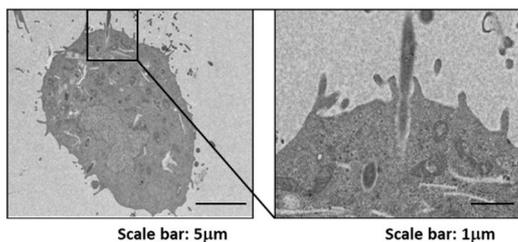
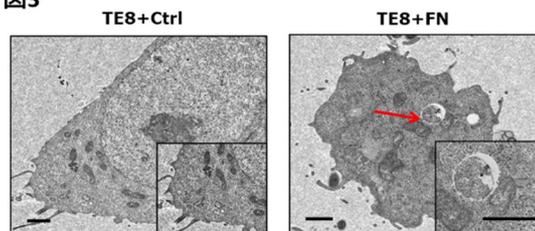
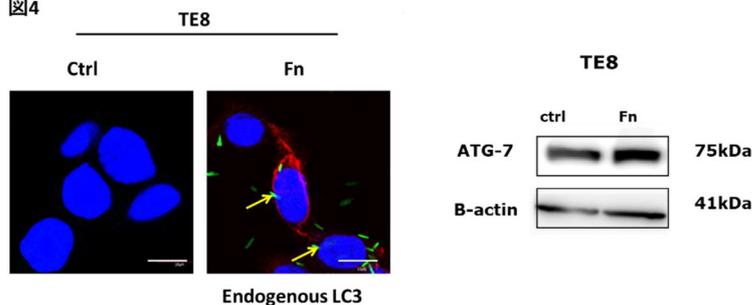


図3



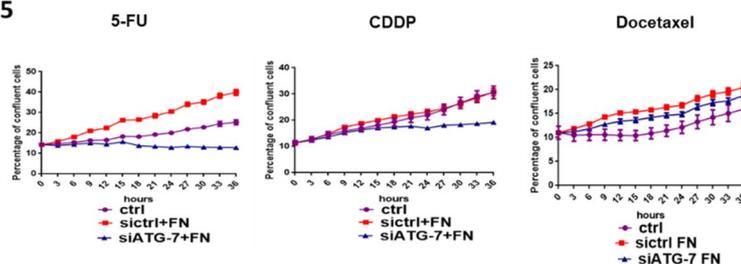
さらに、Fusobacterium nucleatum と培養した癌細胞株では、共焦点顕微鏡により内在性 LC3 が増加すること、western blotting で ATG-7 が上昇することが確認され、autophagy との関係が示された(図4)。

図4



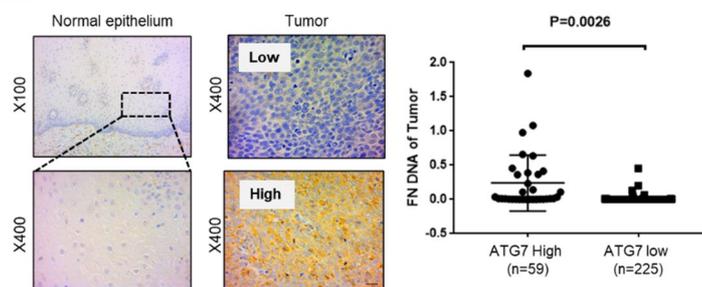
抗癌剤の添加実験において、Fusobacterium nucleatum が autophagy の誘導を介して、抗癌剤抵抗性に寄与していることを明らかにした。ATG7 の発現を SiRNA で抑制したところ、抗癌剤抵抗性が緩和された。

図5



また、臨床データベースにおいても、Fusobacterium nucleatum と autophagy (ATG-7 expression) との関連が示された。

図6



この研究成果は、国際誌 British Journal of Cancer 誌に掲載された。

Liu Y, **Baba Y**, Ishimoto T, Tsutsuki H, Zhang T, Nomoto D, Okadome K, Yamamura K, Harada K, Eto K, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Nagai Y, Iwagami S, Miyamoto Y, Yoshida N, Komohara Y, Ohmuraya M, Wang X, Ajani JA, Sawa T, Baba H.

Fusobacterium nucleatum confers chemoresistance by modulating autophagy in oesophageal squamous cell carcinoma
Br J Cancer. 2020 Dec 10

腸内細菌叢はプロバイオティクス(Probiotics;人体に有益な腸内細菌叢ならびにこれらを含む食品・製品)やプレバイオティクス(Prebiotics;腸内細菌叢のバランスを改善する作用がある物質)により後天的に変化させることができる。今後の研究において、消化器癌進展における *Fusobacterium nucleatum* の役割がより詳細に解明されれば、がん治療の新たな創薬に繋がる可能性があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Liu Yang, Baba Y, Ishimoto T, Tsutsuki H, Zhang Tianli, Nomoto D, Okadome K, Yamamura K, Harada K, Eto K, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Nagai Y, Iwagami S, Miyamoto Y, Yoshida N, Komohara Y, Ohmuraya M, Wang Xiaoming, Ajani Jaffer A., Sawa T, Baba H	4. 巻 124
2. 論文標題 Fusobacterium nucleatum confers chemoresistance by modulating autophagy in oesophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 963 ~ 974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-01198-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mima Kosuke, Kosumi Keisuke, Baba Yoshifumi, Hamada Tsuyoshi, Baba Hideo, Ogino Shuji	4. 巻 140
2. 論文標題 The microbiome, genetics, and gastrointestinal neoplasms: the evolving field of molecular pathological epidemiology to analyze the tumor-immune-microbiome interaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Genetics	6. 最初と最後の頁 725 ~ 746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00439-020-02235-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Uchihara T, Miyake K, Yonemura A, Komohara Y, Itoyama R, Koiwa M, Yasuda T, Arima K, Harada K, Eto K, Hayashi H, Iwatsuki M, Iwagami S, Baba Y, Yoshida N, Yashiro M, Masuda M, Ajani Jaffer A., Tan Patrick, Baba H, Ishimoto T	4. 巻 80
2. 論文標題 Extracellular Vesicles from Cancer-Associated Fibroblasts Containing Annexin A6 Induces FAK-YAP Activation by Stabilizing α 1 Integrin, Enhancing Drug Resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3222 ~ 3235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-3803	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Liu Y, Baba Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, Hiyoshi Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Wu R, Baba H.	4. 巻 54(1)
2. 論文標題 Progress in characterizing the linkage between Fusobacterium nucleatum and gastrointestinal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 33-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-018-1512-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamura Kensuke, Izumi Daisuke, Kandimalla Raju, Sonohara Fuminori, Baba Yoshifumi, Yoshida Naoya, Kodera Yasuhiro, Baba Hideo, Goel Ajay	4. 巻 25
2. 論文標題 Intratumoral Fusobacterium Nucleatum Levels Predict Therapeutic Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6170 ~ 6179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-19-0318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Arima K, Lau MC, Zhao M, Haruki K, Kosumi K, Mima K, Gu M, Vayrynen JP, Twombly TS, Baba Y, Fujiyoshi K, Kishikawa J, Guo C, Baba H, Richards WG, Chan AT, Nishihara R, Meyerhardt JA, Nowak JA, Giannakis M, Fuchs CS, Ogino S	4. 巻 -
2. 論文標題 Metabolic Profiling of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues Discriminates Normal Colon from Colorectal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-19-1091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Haruki K, Kosumi K, Hamada T, Baba Y, Ogino S et al.	4. 巻 250
2. 論文標題 Association of autophagy status with amount of Fusobacterium nucleatum in colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 397 ~ 408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5381	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mima Kosuke, Sakamoto Yuki, Kosumi Keisuke, Ogata Yoko, Miyake Keisuke, Hiyoshi Yukiharu, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Baba Yoshifumi, Iwagami Shiro, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Ogino Shuji, Baba Hideo	4. 巻 32
2. 論文標題 Mucosal cancer-associated microbes and anastomotic leakage after resection of colorectal carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 63 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.suronc.2019.11.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liu Yang, Baba Yoshifumi, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Hiyoshi Yukiharu, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Wu Rong, Baba Hideo	4. 巻 54
2. 論文標題 Progress in characterizing the linkage between <i>Fusobacterium nucleatum</i> and gastrointestinal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 33~41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-018-1512-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小澄敬祐、馬場祥史、山村謙介、岡留一雄、八木泰佑、清住雄希、岩槻政晃、長井洋平、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 食道癌コホートをを用いた <i>Fusobacterium nucleatum</i> と腫瘍免疫の統合解析
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野元大地、馬場祥史、秋山貴彦、岡留一雄、山下晃平、坂本悠樹、大徳暢哉、織田枝里、内原智幸、徳永竜馬、原田和人、山村謙介、江藤弘二郎、日吉幸晴、長井洋平、岩槻政晃、石本崇胤、岩上志朗、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 <i>Fusobacterium nucleatum</i> の食道癌進展への関与とそのメカニズム ; 腫瘍免疫、NF- κ B経路との関連
3. 学会等名 第30回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 美馬浩介、坂本悠樹、江藤弘二郎、日吉幸晴、今井克憲、岩槻政晃、石本崇胤、岩上志朗、馬場祥史、宮本裕士、山下洋市、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 大腸癌肝転移巣における細菌 <i>Fusobacterium nucleatum</i> とCD8陽性T細胞数との関連
3. 学会等名 第40回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田和人、織田枝里、馬場祥史、長井洋平、宮本裕士、石本崇胤、岩槻政晃、吉田直矢、Jaffer A. Ajani、馬場秀夫
2. 発表標題 上部消化管腺癌における腫瘍内Fusobacterium nucleatumと予後
3. 学会等名 第73回日本食道学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場祥史、江藤 弘二郎、日吉 幸晴、長井 洋平、岩槻 政晃、岩上 志朗、宮本 裕士、吉田 直矢、馬場 秀夫
2. 発表標題 Fusobacterium nucleatumはautophagyを介して食道癌の化学療法感受性に影響を及ぼす
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本悠樹、美馬浩介、秋山貴彦、大徳暢哉、日吉幸晴、今井克憲、岩槻政晃、岩上志朗、馬場祥史、宮本裕士、山下洋市、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 大腸癌肝転移形成と細菌Fusobacteriumの関連 Relationship between colon cancer liver metastasis formation and bacteria Fusobacterium
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場祥史、岡留一雄、八木泰佑、黒田大介、澤山浩、日吉幸晴、岩槻政晃、石本崇胤、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 個別化治療を目指したLINE-1メチル化レベル解析：予後予測、早期診断、免疫チェックポイント阻害剤のbiomarkerとしての可能性
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshifumi Baba, Keisuke Kosumi, Daichi Nomoto, Kazuo Okadome, Taisuke Yagi, Yuki Kiyozumi, Kojiro Eto, Yukiharu Hiyoshi, Takatsugu Ishimoto, Masaaki Iwatsuki, Shiro Iwagami, Yuji Miyamoto, Naoya Yoshida, Hideo Baba
2. 発表標題 LINE-1 methylation level and local immune response in esophageal cancer
3. 学会等名 The International Society for Disease of the Esophagus(ISDE) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬場祥史、小澄敬祐、岡留一雄、八木泰佑、清住雄希、江藤弘二郎、日吉幸晴、長井洋平、石本崇胤、岩上志朗、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 食道癌におけるLINE-1メチル化と腫瘍免疫
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬場祥史、山村謙介、江藤弘二郎、日吉幸晴、長井洋平、岩槻政晃、岩上志朗、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 腸内細菌 <i>Fusobacterium nucleatum</i> は食道癌に対する化学療法感受性に影響を与える
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	美馬 浩介 (MIMA Kosuke) (00546559)	熊本大学・病院・特任助教 (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石本 崇胤 (ISHIMOTO Takatsugu) (00594889)	熊本大学・病院・特任准教授 (17401)	
研究分担者	馬場 祥史 (BABA Yoshifumi) (20599708)	熊本大学・病院・特任准教授 (17401)	
研究分担者	今村 裕 (IMAMURA Yu) (70583045)	公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・医長 (72602)	
研究分担者	原田 和人 (HARADA Kazuto) (70608869)	熊本大学・病院・特任助教 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関