

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03755

研究課題名(和文)革新的治療開発を目指した腸内細菌Fusobacteriumと腫瘍免疫の網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive Analysis of Gut Microbiome Fusobacterium and Tumor Immunity for Innovative Therapy Development

研究代表者

馬場 祥史 (Baba, Yoshifumi)

熊本大学・病院・特任准教授

研究者番号：20599708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：Fusobacterium nucleatum陽性食道癌症例では腫瘍浸潤リンパ球が有意に少ないことが明らかになり、Fusoが腫瘍免疫抑制に寄与している可能性が示唆された。この研究成果は、British Journal of Cancer誌に掲載された。さらに、Fusoが腫瘍免疫に影響を与えるメカニズムを解明すべく、癌細胞株の共培養実験を行った。それにより、Fusoが核内レセプターであるNOD 1を介して、NFKB pathwayを活性化し、癌細胞の悪性度の獲得に繋がることになった。この結果をCancer letters誌に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Microbiomeは、近年、癌、肥満、炎症性腸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。また、免疫チェックポイント阻害剤の登場により腫瘍免疫の理解はますます重要となっており、さらに癌におけるmicrobiomeは癌治療・癌化学予防のtargetとして注目を集めていることから、この研究による成果はtranslational researchとして臨床に直結する意義深いものになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Significantly fewer tumor-infiltrating lymphocytes were found in Fusobacterium nucleatum-positive esophageal cancer cases, suggesting that Fuso may contribute to tumor immunosuppression. The results of this study were published in the British Journal of Cancer. To further elucidate the mechanism by which Fuso influences tumor immunity, they performed co-culture experiments with cancer cell lines. They found that Fuso activates the NFKB pathway via the nuclear receptor NOD 1, leading to the malignant gain of cancer cells. The results were reported in Cancer letters.

研究分野：外科腫瘍学

キーワード：腸内細菌叢 食道癌 腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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。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 Y et al. Clin Cancer Res 2016)。さらに、大腸癌においては、大腸癌組織中の F. nucleatum DNA 量が多い症例は腫瘍中 T 細胞数が少ないことが報告されている。そこで、我々は「F. nucleatum が腫瘍免疫応答を制御することにより、食道癌の悪性度に寄与している」というオリジナルの仮説をたて、検証することとした。

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、革新的な治療法の開発が模索されている。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、臨床の現場で使用されるようになった。腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) や癌細胞における PD-L1 発現がその治療効果に影響を及ぼすことが報告されており、腫瘍免疫動態の把握は一層重要になっている。F. nucleatum が腫瘍免疫応答を制御するのならば、免疫チェックポイント阻害剤の効果にも影響を及ぼすこととなる。ひいては、F. nucleatum を治療標的とすることで、免疫チェックポイント阻害剤の効果を上昇させることができるかもしれない。

我々はこれまで 400 例以上の食道癌データバンクを用いて食道癌における腫瘍免疫の重要性を明らかにしてきた。血中リンパ球数と TIL は有意に相関し、全身性免疫状態は腫瘍局所の免疫動態に影響を及ぼした (Ann Surg. 2018)。TIL を peritumoral reaction (PL), follicle, stromal, infiltrating lymphocytes の項目で病理学的に評価したところ、PL のみが予後と相関した (Br J Surgery. 2019)。PD-L1 陽性症例は予後不良であり、予後予測バイオマーカーになりうる (Ann Surg. 2019)。腫瘍関連マクロファージとの共培養により、癌細胞の PD-L1 発現が上昇した (Eur J Cancer. 2019)。これまでではそれぞれのマーカーを個別に解析していたが、今後は Multiplex immunofluorescence (多重蛍光免疫染色) により包括的に解析を行う。

2. 研究の目的

500 例以上の食道癌データバンク・Multiplex immunofluorescence・メタボローム解析を用いて、腸内細菌 Fusobacterium nucleatum と腫瘍免疫動態、代謝環境の関連を網羅的に解析し、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、Syngeneic mouse model, in vitro を用いた機能解析により、Fusobacterium nucleatum が腫瘍免疫、代謝環境へ与えるメカニズムを解明し、microbiome をターゲットとした創薬のためのシーズを探索する。

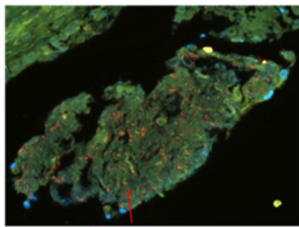
3. 研究の方法

- A) 500 例の食道癌データバンクを用いた腫瘍免疫解析・代謝環境解析
Multiplex immunofluorescence (n=500), メタボローム解析
- B) In vitro での F. nucleatum 機能解析;
- C) Syngeneic mouse model (同系マウス腫瘍モデル) での機能解析;
Multiplex IF で腫瘍免疫評価, メタボローム解析による腫瘍内代謝産物評価

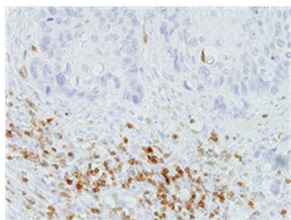
4. 研究成果

実際に食道癌組織中に Fusobacterium nucleatum が存在することを fluorescence in situ hybridization (FISH) で確認した。さらに、Fusobacterium nucleatum と腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocyte; TILs) の関係を検証した。すると、Fusobacterium nucleatum 陽性症例では TILs が有意に少ないことが明らかになり、Fusobacterium nucleatum が腫瘍免疫抑制に寄与している可能性が示唆された。T 細胞マーカーとして CD3 について評価したところ、食道癌でも大腸癌同様 Fuso 陽性症例では CD3 陽性 T 細胞が少なく、腫瘍免疫の抑制に関与していることが示された。この結果は、論文化し Br J Cancer 誌に採択された。Fusobacterium nucleatum が腫瘍免疫に影響を与えることが分かったが、そのメカニズムを解明することを優先的に行う方針とした。

Fluorescence in Situ Hybridization (FISH)

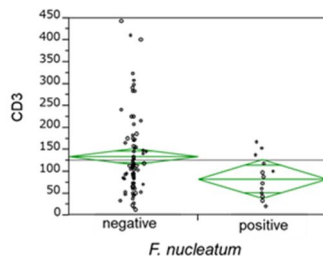
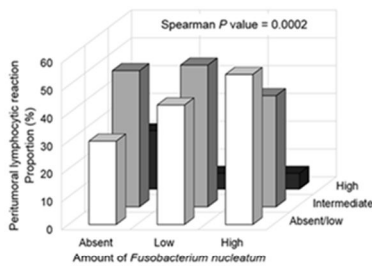


F. nucleatum



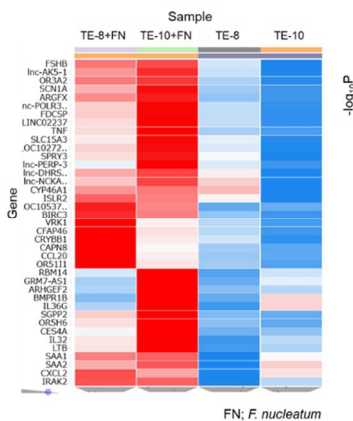
Kosumi K, Baba Y et al. (Br J Cancer)

Fusobacterium陽性症例では
腫瘍免疫が抑制されている

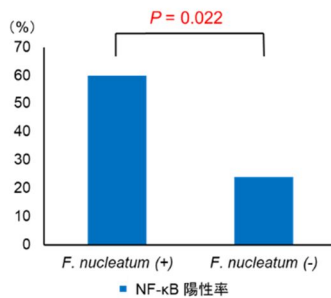


P < 0.001 N=130

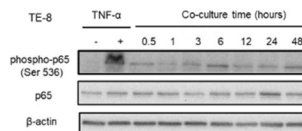
Fusobacterium が食道癌の進展のつながるメカニズムを探るため、単独培養した食道癌細胞株と、F. Nucleatum と共培養した食道癌細胞株、それぞれから RNA を抽出し、DNA マイクロアレイで変動遺伝子を解析した。マイクロアレイの結果を基に KEGG Pathway 解析を行ったところ、NF-κB シグナル経路が top にランクしていることに着目した。食道癌切除組織を用いて NF-κB の活性化について免疫染色で評価を行った。癌部の核が染色されたものを NF-κB 活性化陽性と判定したところ、F. nucleatum 陽性症例で有意に NF-κB 陽性率が高いことが分かった。次に Vitro で食道癌細胞株を F. nucleatum と共培養しタンパク質を抽出すると、Fusobacterium との共培養によりリン酸化 p65 の蛋白質発現が亢進していることを確認した。また癌細胞の p65 を蛍光染色すると、F. nucleatum との共培養の結果、p65 が癌細胞の核内に移行することを確認した。



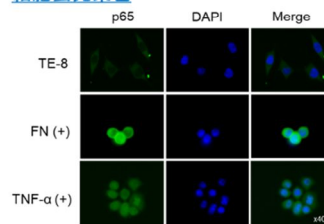
F. nucleatum 陽性症例で
NF-κB陽性率が高い



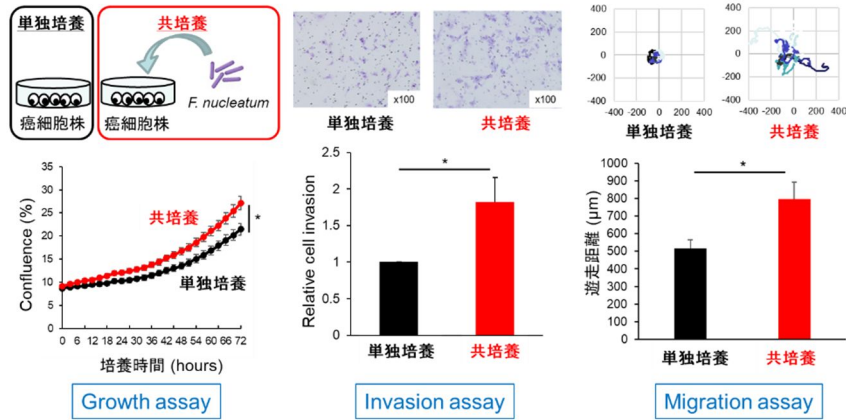
Western blot



細胞蛍光染色

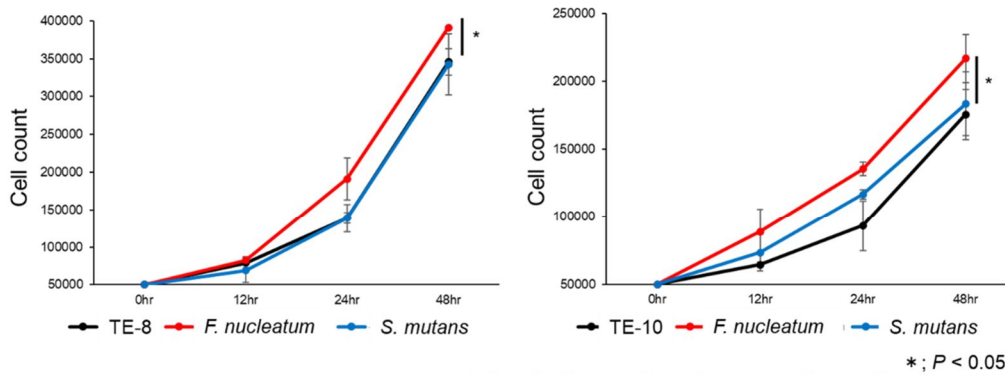


ここまでで食道癌細胞株と Fusobacterium を共培養することで NF-κB の活性化が起こることが示唆された。それに伴い、食道癌の腫瘍進展に変化が起こるかどうか、機能解析実験をすすめたが、増殖能、浸潤能、遊走能いずれも赤の共培養群で亢進していることが分かった。



*; $P < 0.05$

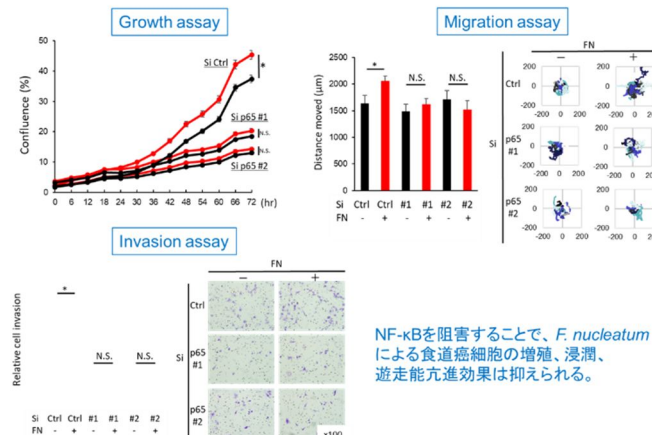
Fusobacterium の腫瘍増殖能が Fusobacterium 特異的なものか評価するため、他の細菌と共培養実験を行うこととした。今回は、Streptococcus mutans という細菌を使用した。Streptococcus mutans は、グラム陽性球菌で、Fusobacterium nucleatum と同様に、ヒトの口腔内に存在し、齲歯などの口腔疾患の原因菌となることが報告されている。食道癌細胞単独培養群、Fusobacterium との共培養群、Streptococcus との共培養群の 3 群で、癌細胞の増殖能を評価した。Fusobacterium との共培養では、腫瘍増殖能が亢進したが、Streptococcus mutans との共培養では腫瘍増殖能が亢進しないことが分かった。



*S. mutans*では癌細胞株の増殖能は亢進せず

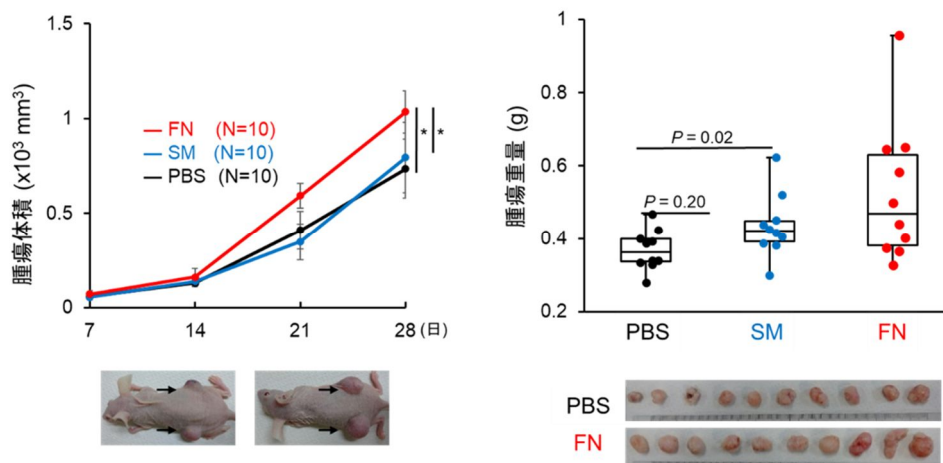
Si RNA を用いて食道癌細胞株の NF- κ B をノックダウンし、機能解析実験を行った。NF- κ B をノックダウンしていない細胞では Fusobacterium 共培養により増殖能が亢進するが、NF- κ B をノックダウンした細胞株では Fusobacterium 共培養による増殖能亢進がみられなくなった。同様の結果が Migration assay, Invasion assay でも確認できた。

NF- κ B 阻害下での機能解析



最後に、食道癌細胞株をヌードマウスに皮下移植した xenograft mouse model を作成し、PBS 投与群、Fusobacterium 投与群、*S. mutans* 投与群に分け、腫瘍体積や腫瘍における Ki-67, p65, NOD1 の発現を評価した。腫瘍体積・重量は PBS 投与群、*S. mutans* 投与群と比較

し、Fusobacterium 投与群に有意に大きくなった。
これらの結果は Cancer Lett 誌に報告した。現在は、もともと予定していた、Syngeneic



mouse model (同系マウス腫瘍モデル)での機能解析を進めている。
Microbiome は後天的に変化させるものであり、疾患治療のターゲットとしてもきわめて有望である。国内の製薬企業において、微生物叢研究を将来の新たな創薬シーズ源として期待する見方が広がりつつあり、複数の企業が、オープンイノベーションのテーマの1つとして「腸内細菌叢」を掲げ、国内のアカデミア研究者などから研究提案を募集している。今回の研究成果により、食道癌における腸内細菌と腫瘍免疫の関係が解明されれば、個々人の microbiome の違いにまで踏み込んで消化器がんの予防や治療選択を行う、Microbiome Based Precision Medicine 時代の幕開けに繋がる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Nomoto Daichi, Baba Yoshifumi, Liu Yang, Tsutsuki Hiroyasu, Okadome Kazuo, Harada Kazuto, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Iwagami Shiro, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Watanabe Masayuki, Moroishi Toshiro, Komohara Yoshihiro, Sawa Tomohiro, Baba Hideo | 4. 巻 530 |
| 2. 論文標題 Fusobacterium nucleatum promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via the NOD1/RIPK2/NF- κ B pathway | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Letters | 6. 最初と最後の頁 59~67 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2022.01.014 | 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 Nomoto Daichi, Baba Yoshifumi, Okadome Kazuo, Yagi Taisuke, Kalikawe Rebecca, Kiyozumi Yuki, Harada Kazuto, Eto Kojiro, Hiyoshi Yukiharu, Nagai Yohei, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Iwagami Shiro, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Komohara Yoshihiro, Watanabe Masayuki, Baba Hideo | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Prognostic impact of PD-1 on tumor infiltrating lymphocytes in 433 resected esophageal cancers | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 The Annals of Thoracic Surgery | 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） 10.1016/j.athoracsur.2021.01.013 | 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 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 馬場祥史 問端 輔 原田和人 江藤弘二郎 小川克大 澤山 浩 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 食道癌における腫瘍免疫及び免疫チェックポイント(PD-1及びPD-L1/2)の網羅的検討 |
| 3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 馬場祥史 野元大地 問端 輔 原田和人 江藤弘二郎 小川克大 澤山 浩 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 食道癌における腫瘍免疫動態の網羅的解析 |
| 3. 学会等名 第72回日本気管食道科学会総会ならびに学術講演会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 馬場祥史 坂本悠樹 馬場秀夫 |
| 2. 発表標題 消化器癌におけるFusobacterium nucleatumの発現意義 原発巣から肝転移巣へ |
| 3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 馬場祥史 野元大地 中村健一 小川克大 原田和人 澤山 浩 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 食道癌における口腔内細菌Fusobacterium nucleatumの存在意義とは？ |
| 3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 馬場祥史 |
| 2. 発表標題 バイオマーカー開発を目指した食道癌における腫瘍免疫及び免疫チェックポイントの網羅的検討 |
| 3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 馬場祥史 |
| 2. 発表標題 食道癌における腫瘍免疫の網羅的解析；免疫関連バイオマーカー開発を目指して |
| 3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2020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 | 馬場 秀夫 (Hideo Baba) (20240905) | 熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401) | |
| 研究分担者 | 澤 智裕 (Tomohiro Sawa) (30284756) | 熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401) | |
| 研究分担者 | 諸石 寿朗 (Toshiro Moroishi) (30647722) | 熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (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 |
|---------|---------|
|---------|---------|