

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22567

研究課題名（和文）大腸がんの転移におけるFusobacteriumの役割解明を目指した萌芽的研究

研究課題名（英文）Role of Fusobacterium in colon cancer metastasis

研究代表者

中島 淳（NAKAJIMA, Atsushi）

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：30326037

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：Fusobacterium（FB）は近年大腸がん患者のがん局所に多量に存在することで注目を集めている。我々は、大腸がんの3次元培養であるオルガノイド培養細胞にFBを添加したところ細胞極性の喪失したことを見出した。この変化は大腸がんを基底膜による足場依存性の極性を持った増殖から浸潤・転移に導くEMT（Epithelial-Mesenchymal Transition /or Transformation, 上皮間葉転換）を起こしていることを遺伝子レベル及び病理学的解析で実証することができた。また大腸がんを用いたマウスがん転移モデルではFBを加えることでがんの転移が促進された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんの転移に細菌が関与するという事はピロリ菌の発見のようなこれまでの常識を覆す画期的な研究となる可能性を秘めている。FBと大腸がんに関してはこれまで多くの論文では接着して増殖を促進して発がん過程の促進をするといった知見であったが、我々の仮説はFBはがんの転移にかかわる役割をしている点で既存の概念を変えるものであり極めて重要である

研究成果の概要（英文）：Fusobacterium (FB) has attracted much attention in recent years due to its high amount of localized cancer in colorectal cancer patients. In our study, we found a loss of cell polarity when FB was added to organoid cultured cells, a three-dimensional culture of colorectal cancer. We have demonstrated by genetic and pathological analysis that this change causes EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition /or Transformation), which leads colorectal cancer from scaffold-dependent polarized proliferation by basement membrane to invasion and metastasis. In addition, we have demonstrated that epithelial-mesenchymal transition/or transformation occurs in colon cancer. In a mouse model of cancer metastasis using colorectal cancer, the addition of FB accelerated the metastasis of the cancer.

研究分野：消化器内科

キーワード：大腸がん がん転移

1. 研究開始当初の背景

Fusobacterium nucleatum は、歯周病菌として知られており、腹腔内感染症の原因菌になるだけでなく、妊娠合併症として、早産や死産、新生児敗血症の原因として報告されている。

2010年代前半より、*Fusobacterium nucleatum* は、大腸癌の発癌に関連している可能性が示唆され、大腸癌検体に多数の *Fusobacterium nucleatum* が qPCR により検出され、リンパ節転移と関連があったことが報告された (1)(2)。また、同じ頃に、以下のような報告がでていす。すなわち、大腸癌患者の粘膜に付着している細菌を調べてみると、*Fusobacterium* をはじめとして、*porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Gemella*, *Mogibacterium*, *Klebsiella* がより多く検出されるのに対して、*Faecalibacterium*, *Blautia*, *Lachnospira*, *Bifidobacterium*, *Anaerostipes* が少なく、大腸癌組織の腸内細菌の多様性は、癌組織より離れた正常組織のそれよりも小さかった (3)。

2015年の報告によれば、大腸癌組織では Firmicutes 門の占拠率が一番高いが、健常人の大腸組織では Proteobacteria 門の占拠率が高いところで違いがある。属レベルでは、大腸癌組織には *Lactococcus* や *Fusobacterium* の占拠率が高く、*Pseudomonas* や *Escherichia-Shigella* が健常人の粘膜よりも占拠率が低いことが示された (4)。また、大腸癌の発癌経路には、主に腺腫から大腸癌に発展する経路 (classical pathway) と、鋸歯状病変から大腸癌に発癌する経路 (serrated pathway) の2つがあるが、前者での腺腫では、腸内細菌の多様性 (diversity) は低下していたが、後者での鋸歯状病変の多様性は低下しておらず、発癌経路によって腸内細菌の変化には違いがある (5)。

このように、大腸癌は腸内細菌叢に強く影響を及ぼすことが分かっている。複数の腸内細菌が大腸癌に関連していると報告されている中でも、特に *Fusobacterium nucleatum* に関する研究報告が相次いで出されたのは、PCR により大腸癌組織や便に *Fusobacterium nucleatum* が検出されており、これがどの報告でも再現性があったからだと思われる。

Fusobacterium nucleatum が発癌に関連するメカニズムとしては、*Fusobacterium nucleatum* に発現している *FadA* や *Fap2* が関連しているといわれており、またリンパ球の癌細胞への攻撃を免れる機構やアポトーシスの回避により大腸癌の進行に関連していると考えられている。さらには、*Fusobacterium nucleatum* は細胞増殖の促進に関連し、マイクロ RNA の過剰発現による、癌抑制遺伝子への影響も論じられており、*Fusobacterium nucleatum* と発癌の関連は非常に複雑である。しかしながら、これら多数の報告が 2010年代からあげられていることを踏まえると、*Fusobacterium nucleatum* は発癌あるいは癌の進行に関わっているはずであるし、本領域の研究はいかに活発に行われているかが分かる。

E-cadherin は細胞接着因子であり、細胞同士をつなぎ止めている。*E-cadherin* の細胞接着の機能が喪失すると、上皮間葉転換 (EMT) といわれる現象が起き、癌の転移が起こりやすくなるため (6)、EMT により大腸癌は転移をしやすくなるという性質をもつ。*Fusobacterium nucleatum* がもつ *FadA* は、細胞接着因子である *E-cadherin* を介して細胞に接着し細胞内に侵入する。β-catenin シグナルを活性化し、Wnt 遺伝子、癌遺伝子の発現を促進させることで、大腸癌の増殖を促進する。*Fusobacterium nucleatum* による発癌メカニズムは、この *FadA* と *E-cadherin* を介さないと、癌細胞の増殖はおこらず、また、*FadA* は正常細胞を増殖させる能力はなく、遺伝子変異が起こってから増殖を促進させる。また、大腸癌の発症を起こす環境には、炎症が深く関与しており、*FadA* は炎症を惹起させることから、炎症による発癌のメカニズムも示唆された (7)。また、大腸癌モデルマウスでは、*Fusobacterium nucleatum* に感染させると、腸炎を起こしていないにもかかわらず、大腸癌組織では *Fusobacterium nucleatum* 非感染モデルに比較して COX-2 や IL-6、TNF-α の発現が亢進していることが報告されており、炎症状態を惹起しやすくなる可能性が示されている (8)。別の報告でも、大腸癌モデルマウスで *Fusobacterium nucleatum* を感染させると、大腸癌の発育は早く、血清中の炎症性サイトカインが上昇していたと示されている。この報告ではさらにマイクロ RNA について述べられている。マイクロ RNA の1つである、miR21 は大腸の炎症を起こし、発癌に関連すると報告されているマイクロ RNA であり (9)、*Fusobacterium nucleatum* に感染の大腸癌において多く見られていた。miR21 の阻害により細胞増殖は抑制され、miR21a ノックアウトマウスでは腫瘍の数やサイズが小さく、生存期間が長かったことから miR21 は癌の増殖に関連していることが推測された。このモデルでは *Fusobacterium nucleatum* 感染により TLR4 / MYD88 / NF-κB pathway を介して NF-κB が活性化され、これにより miR21 の発現が亢進し、RASA1 遺伝子の発現が抑制された。TLR4 はリポ多糖 (LPS)、つまりグラム陰性桿菌のエンドトキシンの受容体であり、炎症反応の活性化に関与することが知られている。RASA1 はそれゆえに、miR21 のターゲットと考えられ、RASA1 による大腸癌抑制をブロックした。ヒトにおいても *Fusobacterium nucleatum* が多量であることと、miR21 の発現は相関しており、生命予後と関連が見られた (10)。また、*Fusobacterium nucleatum* による TLR4 を介した反応は、p21-activated kinase (PAK) を介して、カテニンを活性化させ、発癌に関与していることが示されており、*Fusobacterium nucleatum* 陽性の大腸癌は、陰性の大腸癌に比較して TLR4 / P-

PAK1 カスケードが活性化されていることが報告された (11)。

参考文献

- (1) W E Moore, L H Moore. Intestinal Floras of Populations That Have a High Risk of Colon Cancer. *Appl Environ Microbiol.* 1995 ; 61 : 3202-7.
- (2) Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012 ; 22 : 299-306.
- (3) Chen W, Liu F, Ling Z, et al. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One.* 2012; 7: e39743.
- (4) Zhiguang Gao, Bomin Guo, Renyuan Gao, et al. Microbiota dysbiosis is associated with colorectal cancer. *Front Microbiol.* 2015; 6: 20.
- (5) Peters BA, Dominianni C, Shapiro JA, et al. The gut microbiota in conventional and serrated precursors of colorectal cancer. *Microbiome.* 2016; 4: 69.
- (6) Tsai JH, Yang J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev.* 2013; 27 :2192-2206.
- (7) Rubinstein MR, Wang X, Liu W, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesion. *Cell Host Microbe.* 2013; 14: 195-216.
- (8) Kostic AD, Chun E, Robertson L, et al. *Fusobacterium Nucleatum* Potentiates Intestinal Tumorigenesis and Modulates the Tumor-Immune Microenvironment. *Cell Host Microbe.* 2013; 14: 207-15.
- (9) Shi C, Yang Y, Xia Y, et al. Novel Evidence for an Oncogenic Role of microRNA-21 in Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Gut.* 2016; 65: 1470-81.
- (10) Yang Y, Weng W, Peng J, et al. *Fusobacterium Nucleatum* Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor- κ B, and Up-regulating Expression of MicroRNA-21. *Gastroenterology.* 2017; 152: 851-866.
- (11) Chen Y, Peng Y, Yu J, et al. Invasive *Fusobacterium nucleatum* activates beta-catenin signaling in colorectal cancer via a TLR4/P-PAK1 cascade. *Oncotarget.* 2017; 8: 31802–31814.

2 . 研究の目的

『我々は、大腸がんの3次元培養であるオルガノイド培養細胞にFBを添加したところ驚いたことに培養液中でFBがオルガノイドに向かって猛烈な勢いで遊走して接着し、その後空洞形成をした球形のオルガノイドが桑実様にシュリンクする(細胞極性の喪失)ことを偶然見出した。』この発見は大腸がんはFBを呼び寄せる走化性因子を分泌しているのではないかとまたFBの接着は大腸がんを基底膜による足場依存性の極性を持った増殖から浸潤・転移に導くEMT(Epithelial-Mesenchymal Transition /or Transformation, 上皮間葉転換)を惹起させているのではないかとこのまで全く想定されてなかった新しい仮説を立てるに至った。今回の研究の目的はヒト大腸がん組織で高率に検出される細菌であるFBに関して、本細菌が大腸がんによって分泌される走化性因子でがん組織に遊走され、さらには菌との接着を通して大腸がんの浸潤や転移にかかわっていることを証明しその機序を明らかにすることである。得られた結果は「細菌ががんの転移を促す」といったこれまでの概念を覆す革新的知見である。

オルガノイド (organoid) とは人為的に創出された器官に類似した組織体で現在適切な日本語がない。近年の培養技術の進歩で、基底膜類似マトリックスの開発や無血清培地の開発などで、研究室で患者大腸がんの生検検体等より容易に3次元でのオルガノイドの培養が可能となってきた。2次元での培養がん細胞とは異なり極性を持ち人体でのがん組織にあるがままの遺伝子異常を保持していることが特徴である。

3. 研究の方法

本研究の進め方を以下に列挙する(1)培養大腸がんオルガノイドでFB添加により浸潤・転移能の獲得の証拠となる上皮間葉転換(EMT)が起きるかの検討: EMTの証明はオルガノイドにFBを投与した際のE-cadherin, N-cadherin, SMA, ビメンチンなどの接着因子の変化さらには浸潤能の直接アッセイはBoyden Chamber Cell Migrationアッセイを行う(微小な穴のあいた膜上でオルガノイドを培養して、もし浸潤・転移能があれば膜上部から膜を通過して膜下部に移動可能であり膜の裏の細胞をカウントすることで定量化する)。以上の検討でEMTの現象を確認できればその分子機序の解明をEMTにかかわるRac1などsmall GTPaseの解析やRNA seqを通して解明する。

(2)ヒト大腸がん組織でのFBの存在分布、大腸がん肝転移巣にFBが存在するかの検討:

ヒト大腸がん肝転移の切除標本を用いて転移巣にFBが存在するかをPCR及び免疫染色を用いて検討する。免疫染色は現状の抗体にやや難があり組織の染色はin situ hybridization (ISH)法も用いる。これにより肝臓という無菌状態の組織でも大腸がんがFBと共存しているか、またその場所はどこかなどが明らかにできる。

(3)マウス大腸がん肝転移モデルで原発巣でのFBの有無が肝転移の差となるかの動物実験:

マウスモデルで腸管に移植した大腸がんオルガノイドが肝臓に転移するモデルでFBの有無で転移能の変化が起きるかの検討を行う。その際に原発巣のFBが転移巣に認められるかの解析も行う。

(4)大腸がんの分泌する液性因子に向かってFBは遊走するか?またChemotactic factorは何か?: chemotactic chamberを用いて大腸がんオルガノイドの分泌する液性因子にFBが走化性を示すかの検討を行い。その因子を熱処理などによりタンパク質なら2D電気泳動を行ってプロテオミクス解析によりたんぱく質の同定を行う。非たんぱく質であればメタボローム解析等の網羅的解析を駆使して同定を試みる。

4. 研究成果

(1)培養大腸がんオルガノイドでFB添加により浸潤・転移能の獲得の証拠となる上皮間葉転換(EMT)が起きるかの検討: 大腸オルガノイドにFusobacteriumを添加したところ形態変化が起き、図のように胞胚状の球形のオルガノイドが桑実状の細胞塊状になった。その際にEMTを示唆するE-Cadherinなどの変化を認め、マトリゲルによる浸潤試験で浸潤能の獲得、またスクラッチテストでも浸潤能の亢進を認めた。現在さらに詳細を解析中である。

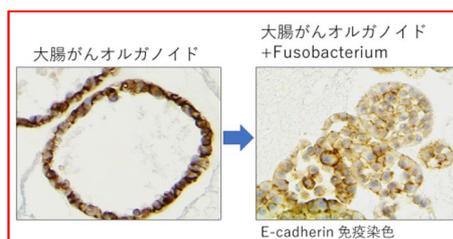
(2)ヒト大腸がん組織でのFBの存在分布、大腸がん肝転移巣にFBが存在するかの検討:

ヒト大腸がん肝転移の切除標本を用いて転移巣にFBが存在するかをPCR及び免疫染色を用いて検討を行っているが、現在in situ hybridization (ISH)法を用いて検討しているが検出方法の確立に苦慮している。

(3)マウス大腸がん転移モデルにおいては現在解析を行っている。

(4)走化性因子に関しては解析中でありいまだ液性因子は同定されていない。

以上より今後まだまだ時間がかかる予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------