

総 説 (2022年度横浜市立大学医学会賞受賞研究)

大腸癌の予防に向けた 口腔内/腸内細菌に注目したトランスレーショナル研究

日 暮 琢 磨

横浜市立大学医学部 肝胆膵消化器病学

要 旨: 本邦の大腸癌は罹患率・死亡率ともに高く、対策の必要性が訴えられている。近年、腸内細菌と大腸癌についての研究が数多く行われ、少しずつ腸内細菌と大腸癌の関係が明らかとなってきている。著者らは腸内細菌と大腸癌について基礎/臨床にわたって橋渡し研究を行った。本稿ではその取り組みについて概説する。

はじめに、大腸癌と関連があると報告されている、*Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) がもともと口腔内で歯周病菌として認識されていることに注目し、大腸内で大腸発癌に関わっている *F. nucleatum* が口腔内由来であると仮説をたて、その検証を行った。培養法を用いて大腸癌患者の唾液、大腸癌組織から *F. nucleatum* を単離し、それぞれの菌株について検討を行ったところ、100%に口腔内で *F. nucleatum* が検出され、そのうち75%が大腸癌でも同一株の *F. nucleatum* を有していた。このことは、*F. nucleatum* が口腔内由来であることを示唆している。更に、同一株の検討を手間のかかる培養法ではなく、AP-PCR法で簡便に行える方法を開発した。

また歯周病を有する患者を対象に歯周病治療を行うと、便中の *F. nucleatum* DNA量を減少させることができることを示した。このことは歯周病治療を行うことにより大腸癌を予防するという画期的な方法の可能性を示したといえる。

Key words: 大腸癌 (Colorectal Cancer), 予防 (Prevention), 橋渡し研究 (Translational research), 化学予防 (Chemoprevention), 腸内細菌 (Microbiota)

はじめに

本邦の大腸癌は罹患率・死亡率ともに高く、2021年の大腸癌の死亡数は女性で第1位、男性では第2位となっており、また罹患数は男女ともに2位となっており、今後も横ばいから増加が予想されている。これまで大腸癌は50代以降に多くが発症すると考えられており、本邦においても便潜血の検診は40代以降から行われている。しかし、1990年代以前はほとんどいないと考えられていた50代以下の若年発症の若年大腸癌は近年年率2%程度増加しており、ついに1990年の2倍になり現在も増加傾向である。若年大腸癌は社会的、経済的な損失も大きく、

2020年にはアメリカ国立癌研究所のProvocative Questionsのトップの問題に選ばれるなど多くの癌研究者の間で問題意識が高まっており、早期ライフステージからの対策の必要性が訴えられている。若年大腸癌の原因として、肥満、運動不足、食事、腸内細菌、炎症などが相互に作用して影響している可能性が指摘されているが、まだはっきり特定されたものはない。

近年、FISH、定量的PCR法、16S rRNAをターゲットにした次世代シーケンサー (New Generation sequencer: NGS) の解析などの発達によって多種に及ぶヒト常在細菌叢が迅速かつ特異的に検出可能となりヒト常在細菌プロファイルが解明されてきた。この進歩に伴い、アレ

ギーや肥満、認知症、癌などとヒト常在細菌叢との関連が明らかになりつつあり、大腸癌についても数多くの研究が始められている。著者らは腸内細菌と大腸癌について基礎/臨床にわたって橋渡し研究を行った。本稿ではその取り組みについて概説する。

大腸癌と腸内細菌の関係

大腸癌においては腸内細菌が発症と関連していると言われ始めたのは比較的最近のことであるが、1995年の報告では、15種の腸内細菌が大腸癌リスクの高い細菌としてあげられた¹⁾。これは大腸ポリープを有する患者と、西洋食摂取の習慣のある人と、そうでない人と比較して同定された結果である。当時の細菌学では基本的には培養法を中心に解析が行われてきたが、本法の弱点としては、培養できない菌は同定不可能であり、腸内に存在する多くの菌が見逃されていた。しかし、2000年代に入りNGSが登場してきたことにより多種の菌種が迅速かつ特異的に検出可能となったことにより、常在細菌叢を対象とした研究が一気に進んできた²⁾。大腸癌においては、*Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) が大腸癌と深く関連していると多数報告されるようになってきている。

それでは次項でこの*F. nucleatum*について詳しく解説する。

F. nucleatum について

F. nucleatum は *Fusobacterium* 属に属し紡錘状のグラム陰性偏性嫌気性桿菌であり、口腔、気道、消化管に常在している。特に歯科領域では歯周病菌として知られている。

I 腸内細菌としての *F. nucleatum* と大腸癌について

大腸癌組織や便中の*F. nucleatum*を従来のPCRや、digital PCRといった手法で定量・評価している報告は*F. nucleatum*が大腸癌と関連があると報告され始めてから、次々と報告されている。

大腸癌組織の*F. nucleatum*のDNA量をdigital PCRで調べた報告では、正常組織に比較して大腸癌組織のDNA量は有意に多く、病期ごとにDNA量を検討すると、病期が進行すればDNA量が多くなる傾向があり、また大腸癌組織のDNA量が多い患者は、生命予後が短くなることが示されている³⁾。従来のPCRにおいても、Mimaらは大腸癌組織中のDNA量が多い症例については、生命予後が悪いことを示している⁴⁾。ドイツ、チェコ、アイルランドにおいても、同様に大腸癌患者の便中の*F. nucleatum*のDNAが多い症例では大腸癌の生命予後は悪化していた⁵⁾。

このように*F. nucleatum*は大腸癌との関連が数多く報告されており、近年は大腸発癌の過程にどのように関わっ

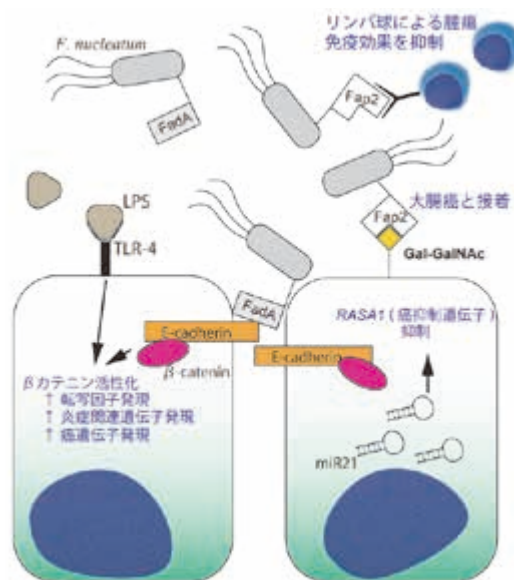


図1 *F. nucleatum*による大腸癌への関与

ているかの解明も進んできている。

*F. nucleatum*が発癌に関連するメカニズムとしては、*F. nucleatum*に発現しているFadAやFap2が関連し、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、*F. 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、癌抑制遺伝子に影響するとも考えられ、*F. nucleatum*と発癌の関連は非常に複雑である。その概要を図1に示す。

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いという性質をもつ。*F. 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。さらに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。*F. nucleatum*による発癌メカニズムは、このFadAとE-cadherinを介さない、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ている⁷⁾。また、大腸癌モデルマウスでは、*F. nucleatum*を投与すると、腸炎を起こしていないにもかかわらず、大腸癌組織では*F. 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*F. 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⁾、*F. nucleatum*に感染の大腸癌組織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*F. nucleatum*感染によりTLR4 / MYD88 / NF κ B pathway を介してNF κ B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*F. 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、*F. nucleatum*によるTLR4を介した反応は、p21-activated kinase (PAK)を介して、 β 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、*F. 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¹¹⁾。

また*F. nucleatum*と大腸癌が接着するメカニズムに関連するのがFap2である。大腸癌細胞には、D-galactose- β (1-3)-N-acetyl-D-galactosamine (Gal-GalNAc) という糖鎖が過剰に発現しており、*F. nucleatum*に発現しているFap2がこれを認識し、*F. nucleatum*が大腸癌に多く接着するメカニズムとなっている。先述したE-cadherinについては、大腸癌以外にも有する細胞が多く存在し、また大腸腺腫や大腸癌では様々なレベルでE-cadherinが発現していることから、FadAからE-cadherinの発癌経路以外にも、Fap2を介したメカニズムが存在し、Gal-GalNAcとFap2結合を阻害することで*F. nucleatum*が大腸癌に付着するのを防げるのではないかと考察されている¹²⁾。

*F. nucleatum*が大腸癌に及ぼす影響は、免疫システムにも及ぶことが報告されている。例えば、大腸癌組織中のリンパ球は*F. nucleatum*が多量の場合は減少しているとの報告がある。癌組織中のT細胞が多ければ、免疫により癌細胞を攻撃することができるので、生命予後がよいといわれている。*F. nucleatum*はT細胞を減少させることによって、生命予後を悪化させる可能性が報告されている。T細胞を減少させる機序は不明だが、何らかの機序によりアポトーシスを促進させていると考察されている¹³⁾。また、前述したFap2が関連している報告では、Fap2はNK細胞をはじめとしたT細胞に発現しているTIGIT (T cell immunoglobulin and ITIM domain) に結合することで、NK細胞の腫瘍への細胞傷害効果を抑制して



図2 歯面を覆うバイオフィルムのシェーマ (文献16より引用改編)

しまい、大腸癌の進行を促進してしまう¹⁴⁾。そのため、Fap2阻害が*F. nucleatum*陽性の大腸癌の進行を抑制する可能性があり、大腸癌予防のターゲットとなる可能性がある。免疫システムからの回避については、大腸癌モデルマウスで*F. nucleatum*を感染させると、腸管内の骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC)が増加していることから確認されている⁸⁾。MDSCは制御性T細胞とともに過剰な免疫を抑制する細胞である。つまり*F. nucleatum*感染により腫瘍を攻撃するT細胞やNK細胞、樹状細胞から攻撃を逃れるシステムが構築されてしまう可能性があるということである。これまでの報告から考えると、*F. nucleatum*の免疫システムからの回避は大腸癌の発癌には直接関連がなく、どちらかという大腸癌の進行に関係していることが推測される。

II 口腔内細菌 / 歯周病菌としての *F. nucleatum*

前項では大腸癌と腸内細菌としての*F. nucleatum*に焦点をあてて解説したが、*F. nucleatum*は従来、口腔内常在菌として知られている。本項では口腔内細菌 / 歯周病菌としての*F. nucleatum*に焦点をあてる。

口腔内には、未同定の細菌を含め、約700種類の細菌が生息しているといわれている。それらは出生直後から母親や近親者から伝搬した細菌が歯面や粘膜面に付着し、複雑なバイオフィルムを形成するため外来性の細菌が付着増殖することは困難である。つまり口腔の感染症の多くは、口腔内常在菌が原因である。また、個々の細菌は病原性が弱く、単独で疾患を起こすのではなく混合感染の様式をとる¹⁵⁾。主な生息部位はデンタルプラークで、典型的なバイオフィルムを形成する。さらに、歯肉縁上と縁下プラークとでは菌叢が異なり、前者では通性嫌気性グラム陽性レンサ球菌が中心に、グラム陽性桿菌が共存する。一方、縁下プラークからは、通性嫌気性グラム陽性レンサ球菌や桿菌が検出されるものの、偏性嫌気性グラム陰性桿菌も生息する。プラーク形成菌は凝集性が

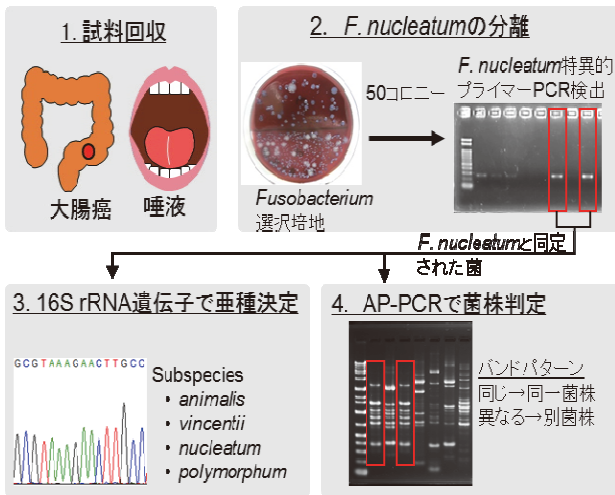


図3 本研究のシエマ

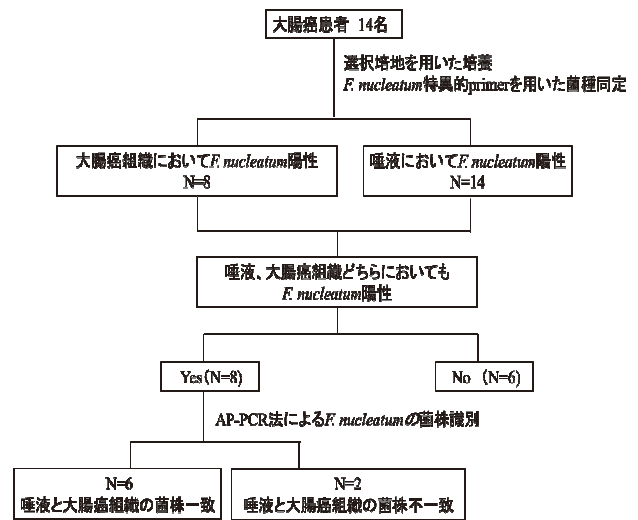


図4 本研究の流れ

強く、単一菌種の凝集だけではなく、異菌種間凝集が見られる(図2)¹⁶⁾。

これらの中で低pH環境でも生育可能な*Prevotella*や*Fusobacterium*は、歯肉溝(浅い歯周ポケット)に定着し、自らの代謝活性によって環境pHを中和し、中性pH環境に適応して歯周病原性(タンパク質分解酵素活性、宿主障害性代謝産物の産生など)を増強させるといわれている¹⁷⁾。そして歯周病関連菌と呼ばれる菌のうち、Red complexと呼ばれる*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*の3菌種をはじめとする嫌気性グラム陰性桿菌群が、歯肉溝滲出液と剥離上皮を栄養源にして増殖し歯周病が発症すると考えられている¹⁸⁾。このように*F. nucleatum*は病原性は弱い、歯周病菌とバイオフィルムを凝集し歯周病の間接的な原因となっている。

口腔内*F. nucleatum*と腸管内*F. nucleatum*の関係

先述のように*F. nucleatum*は歯科治療領域では歯周病関連菌として認識されているが、大腸癌と深く関連が示唆されている腸内細菌としての*F. nucleatum*と口腔内細菌の同菌との関連は不明であった。口腔内では健康人であってもほぼ100%*F. nucleatum*が検出されるが、腸内では検出されない例も多いため、我々は大腸癌と関連のある*F. nucleatum*は口腔内由来であるという仮説を立てて研究を行った。

方法 大腸癌と診断された患者から同意を得て、唾液と大腸癌組織を採取した。唾液および大腸癌組織中の細菌を培地で培養し増やしたのちに、*Fusobacterium* 選択培地を用いて*F. nucleatum*を単離培養した。単離した*F. nucleatum*を arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR)を用いて株レベルで識別を行い、口腔内と大腸

結果の一例

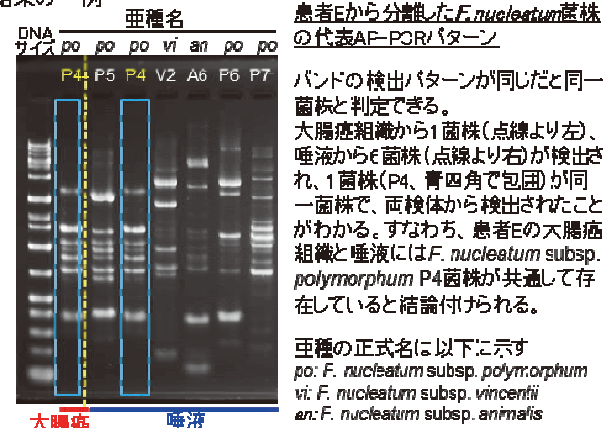


図5 AP-PCR法による菌株の識別

癌組織中の*F. nucleatum*の株の相同性を確認した(図3)。

結果 大腸内視鏡検査で大腸がんが診断された84人の患者のうち、悪性疾患の病歴、家族性腺腫性ポリポシス、炎症性腸疾患、直近の抗生剤使用歴などを除外し、組み入れ基準を満たした14名から、内視鏡を用いて大腸癌組織を採取し、また唾液検体を採取した。唾液からは全例*F. nucleatum*が検出された。一方、大腸癌組織からは8名が*F. nucleatum*が検出された。この大腸癌組織と唾液両方から*F. nucleatum*が検出された検体に対してAP-PCR法で株レベルの識別を行ったところ、75%(6/8例)で唾液と大腸癌組織の両方で同一株の*F. nucleatum*が検出された(図4, 5)。

また、*F. nucleatum*はステージ0からステージIVの検体から検出されており、このことから、*F. nucleatum*が腫瘍形成の初期段階より大腸がん組織に付着する可能性があることが示された。以上の結果より、大腸がんとの関連が指摘されている*F. nucleatum*は、口腔内由来であることが強く示唆された¹⁹⁾。

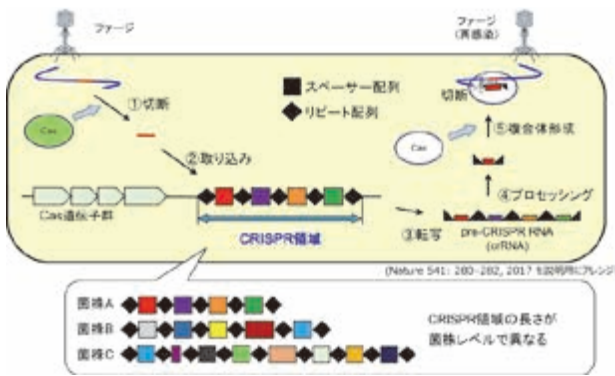


図6 CRISPR-Casシステムを利用した *F. nucleatum* 菌株識別ジェノタイピング法の標的

本研究の更なる発展

本研究を含め菌株レベルの研究には、*F. nucleatum* を分離・培養して各分離株のゲノムを個別に解析する必要があり、熟練した分離・培養スキルに加え、時間およびコスト面の問題もあることから、汎用するには多くの課題があった。そこでこれらの課題を解決し、正確かつ簡便に大腸がん患者の検体から *F. nucleatum* を菌株レベルで識別する方法の開発に着手した。具体的には、*F. nucleatum* を含む約半数の細菌が保有する免疫機構であるCRISPR-Casシステムに着目し、過去に感染を受けたファージの遺伝子断片が保存されている遺伝子領域を標的としてPCR増幅し、菌株毎の感染歴の違いを増幅されたDNA断片長の違いとして検出することで、菌株を識別する手法（ジェノタイピング法）の確立を行った（図6）。

はじめに、*F. nucleatum* が保有するCRISPR-Casシステムの探索から始め、研究開始当初に全ゲノム情報が登録されていた *F. nucleatum* および我々が分離した菌株の合計26菌株を用いて調べた結果、4タイプのCRISPR-Casシステムを保有していることがわかった（タイプI-B1、タイプI-B2、タイプII-A、タイプIII-A）。次に、CRISPR-Casシステムの中で、細菌の免疫機構に関連する過去に感染を受けたファージのDNA等の断片配列が挿入されているCRISPR関連領域「繰り返し配列（リピート配列）」とその間に挿入されている感染ファージのDNA断片（スペーサー配列）の繰り返しを増幅するプライマーおよびPCR条件を4タイプそれぞれに構築した（*F. nucleatum* 菌株識別ジェノタイピング法）。

完成した *F. nucleatum* 菌株識別ジェノタイピング法（以降「本ジェノタイピング法」という）を用いた *F. nucleatum* の各亜種の基準株の解析例を図7に示す。各々のCRISPR関連領域で増幅バンドが検出された菌株はそのCRISPR関連領域を保有していることを示しており、この増幅物の塩基配列を解読したところ、リピート配列とその間のスペーサー配列の繰り返しを確認でき、

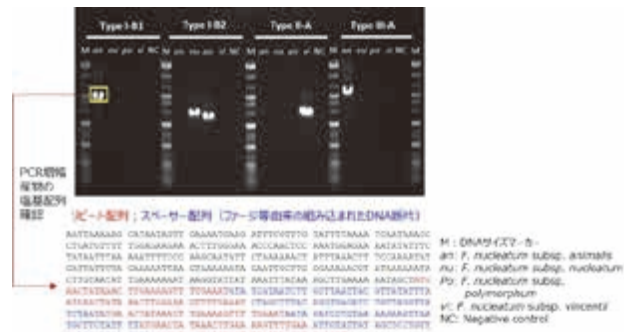


図7 本研究で構築した *F. nucleatum* 菌株識別ジェノタイピング法を用いた *F. nucleatum* 基準株（4亜種）の解析例

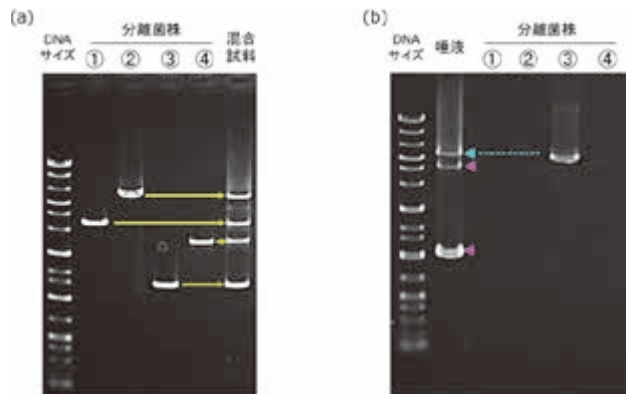


図8 分離菌株の混合試料および唾液試料とその分離菌株を本ジェノタイピング法で解析した結果の一例（タイプI-B1を抜粋）

本手法で狙い通りCRISPR関連領域が増幅できていることが証明できた。

また、複数の菌株が混合している検体において、各菌株が識別できるのかを確認するために、菌株を人為的に混合した複数菌株由来の試料を解析した結果、明瞭に別サイズのPCR増幅物が得られ、各菌株を識別することができた（図8a）。さらに、唾液ゲノムDNA試料とその唾液試料から分離された菌株を比較したところ、分離菌株と同サイズのPCR増幅物が確認されると共に、唾液試料からは別のサイズのPCR増幅物も検出された（図8b）。これは、培養法では分離し切れなかった *F. nucleatum* 菌株が、唾液中に存在していることを示しており、試料中の *F. nucleatum* 菌株検出力は、本ジェノタイピング法の方が培養法よりも高いことを示している（図9）²⁰。

歯周病治療による大腸癌予防の可能性

先述のように、大腸癌で増殖している *F. nucleatum* は口腔内由来である。厚生労働省の歯科疾患実態調査によれば、近年はう歯（虫歯）は減少傾向であるのに対して、歯周病は幼少期、学童期から急増しており、歯の喪失原因の現在一位は歯周病である。この歯周病の増加は、若年大腸癌の増加と時期を同じにしており、若年大腸癌増

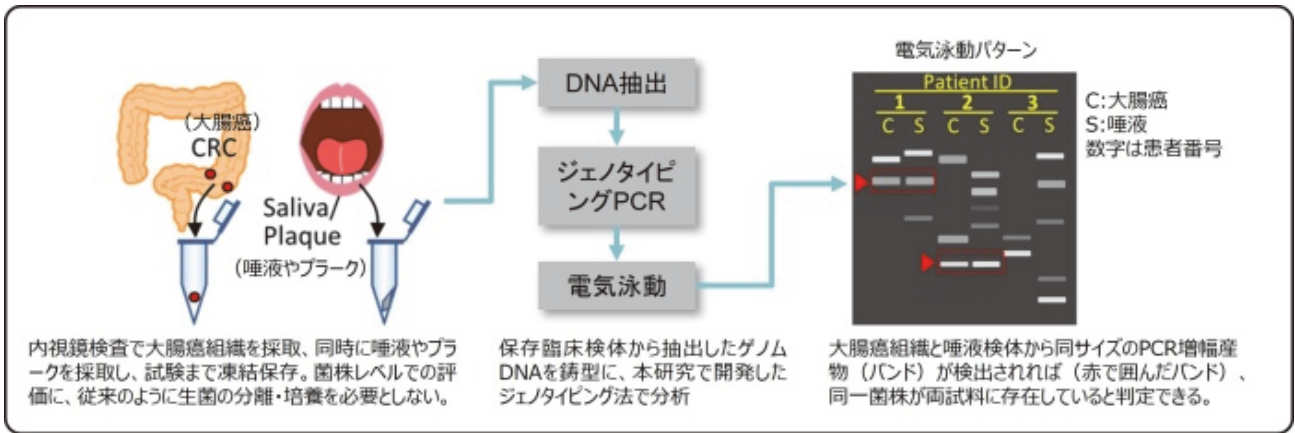


図9 本研究のシェーマ

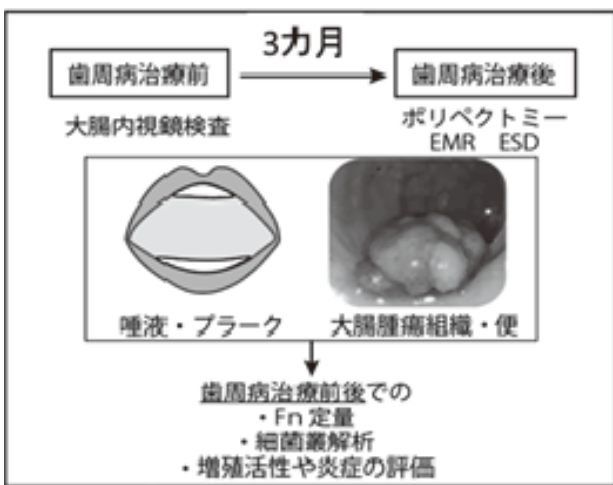


図10 研究のシェーマ

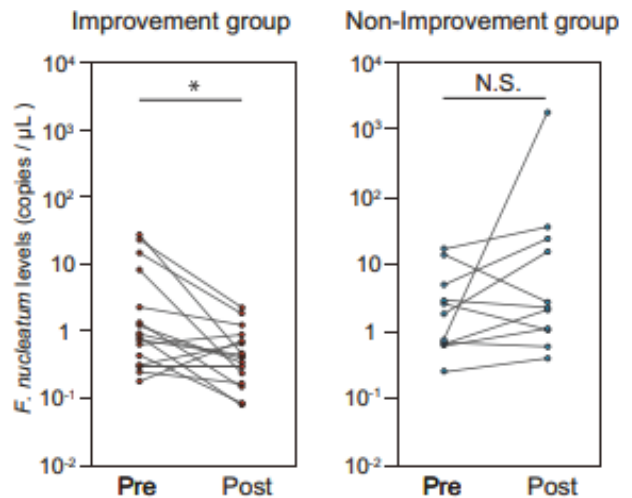


図12 歯周病治療改善群と非改善群の便中*F. nucleatum*のDNA量の推移



図11 研究の流れ

加の原因の一つは歯周病の増加であるという仮説を立てた。例えば、胃癌においては*H.pylori*を除菌することにより胃癌予防が行われている。そこで、歯周病対策により*F. nucleatum*を制御しそれにより大腸癌リスクの低下を目指すという革新的な予防法を考案し、予備研究を実施した。

I 方法

内視鏡治療を行う予定の患者に対して歯科受診し歯周病検査を行い、唾液、プラークを採取する。また初回内視鏡時に便、大腸組織を採取する。歯周病のある患者はその後歯科で徹底的なプラークの清掃、ブラッシング指導を行い、3か月間治療を行う。3か月後に唾液、プラークを採取し、歯周病治療効果を判定し、切除予定の大腸腫瘍を内視鏡治療を行う。その際に再度、便、大腸組織を採取し、菌叢解析および*Fn*の菌量変化を解析する。それにより、歯周病治療が腸内細菌に与える影響を解析する。また切除した大腸腫瘍はKi-67などの増殖マーカーや遺伝子検索を行い、歯周病治療の効果を判定する(図10)。

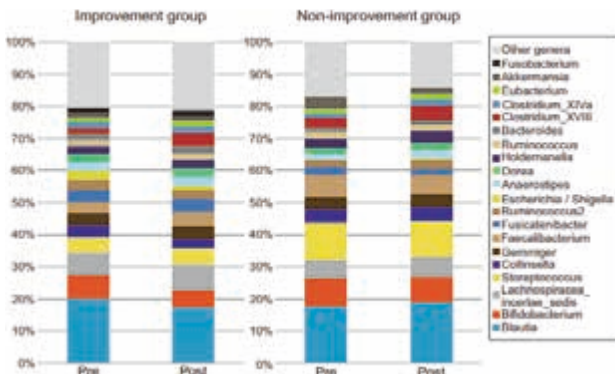


図13a 歯周病改善群と非改善群の便中腸内細菌叢の変化

II 結果

研究に58名がエントリー、組み入れ基準を満たした歯周病患者37名と歯周病のない5名が試験に参加した。歯周病患者の37名が3か月間の歯周病治療を受け、治療後評価を30名が受けた(図11)。最終解析の結果、歯周病が改善した16名と改善のなかった11名、歯周病なしの4名に対して最終解析が行われた。歯周病が改善していた群では便中*F. nucleatum* DNA量が有意に減少していたのに対し、改善のなかった群では便中*F. nucleatum* DNA量の変化は認めなかった(図12)。

一方で、歯周病の改善ありなしに関わらず、腸内細菌叢および腸内細菌叢の多様性は変化を認めなかった(図13a.b)²¹⁾。

口腔内/腸内細菌と大腸癌研究の今後の展望

我々は、大腸癌で増殖している*F. nucleatum*が高率に口腔内の*F. nucleatum*と同一株であることを示した。また、口腔内では全例が*F. nucleatum*が検出されたが、大腸癌では約6割程度に*F. nucleatum*が検出されており、さらに歯周病治療を行うと便中*F. nucleatum* DNA量が減少する。このことは、腸管内の*F. nucleatum*は口腔内に由来していることを示している。では、この仮説が正しいとすると、どのような移行経路があるのだろうか。まず考えられる経路として、唾液とともに嚥下してそれが消化管を通して大腸に到達し増殖、定着するという経路である。我々は、日々多量の唾液を常時、嚥下しておりこれが消化管を通過して、大腸に定着しているという説である。しかしながら大腸に到達するまでには酸性環境の胃や、胆汁酸が多く存在する小腸を通過しなければならないため、本当に*F. nucleatum*が消化管を経由して大腸に到達するまでに生存しているかは不明である。他に考えられる経路としては、口腔内から血中に侵入し血行性に大腸に到達するという説である。この説の根拠としては、歯周病患者で、歯磨きをした後に採血をしてPCR

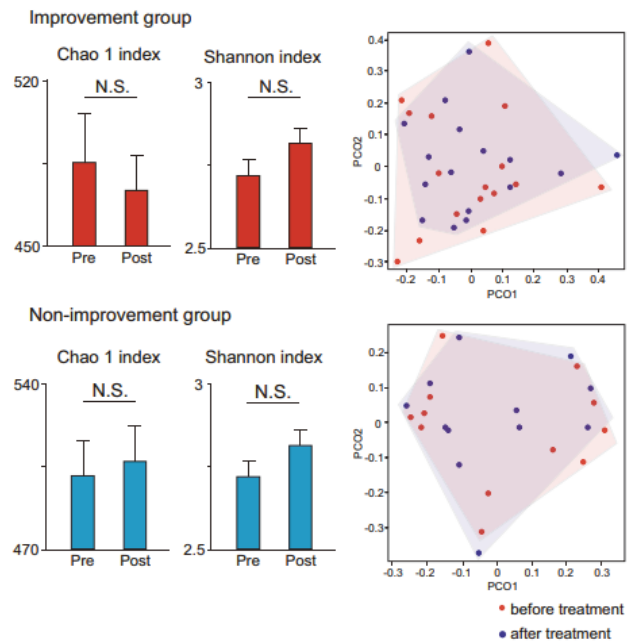


図13b 腸内細菌叢の多様性の変化

により解析したところ、菌血症を起こしていることが報告されており、特に肝硬変の患者ではその所見が顕著であったことから、歯周病患者においては自身でおこなう処置によって、微小ながらも容易に菌血症を起こすという報告によるものである²²⁾。他にも、大腸癌マウスモデルにおいて*F. nucleatum*を尾静脈注射したものについては、大腸癌に*F. nucleatum*が多量に検出されていたことから、*F. nucleatum*が血行性に大腸癌に付着(感染)したことが示されたため、ヒトにおいても同様に血行性に大腸癌に付着する経路も認められるかもしれない²³⁾。また、口腔内細菌が産生するバイオフィルムが大腸にも作用し、慢性的な炎症を引き起こすことにより、大腸癌発癌のメカニズムとなっているといった報告もある²⁴⁾。いずれにしても、移行経路を明らかにするためには今後更なる研究が必要である。

次に、本知見を臨床応用する方策として、大腸癌診断に応用が可能なかを現在検討している。大腸癌は現在、便潜血で一次検診を行い、二次検診として内視鏡検査が推奨されている。これは、検診で内視鏡を実施するためのコスト、内視鏡受け入れ態勢などの問題のためである。しかし、本邦ではそもそもの一次検診の受診率が低く、さらに陽性になっても二次検診に進まない受診者も多い。食生活の欧米化などとともにこのように一次、二次検診の低受診率は本邦の大腸癌罹患率、死亡率を押し上げている原因となっている。一方で、対策がうまくいっている胃痛に目を向けてみると、胃痛の原因菌である*H. pylori*を用いて胃痛の高リスク状態である萎縮性胃炎の拾い上げ、除菌療法による胃痛リスクの低減化など、臨床応用されており、罹患率、死亡率の低下につながっている。

そのため、胃癌対策を参考に、*F. nucleatum*と大腸癌をうまく臨床応用できないかと考えている。唾液中にはほぼ全例に*F. nucleatum*がいるため、口腔内の*F. nucleatum*を検出するだけでは大腸癌高リスクを絞り込むことはできないが、我々の研究結果をみても、口腔内からは2-8株ほどの*F. nucleatum*が同定される。しかしこれらの株が全て大腸癌組織中で検出されるわけではないため、経消化管にせよ経血行性にせよ大腸に移行する/できる何らかの特徴をもっている可能性がある。そのため、このような特徴をもつ*F. nucleatum*を検出することができれば大腸癌の高リスクをしばりこむことができ、大腸癌早期診断につなげることが可能となるかもしれない。さらには、特徴が明らかとなればその接着を予防するなど特異的な予防法へも繋がる可能性もある。

そのほかに、従来の便潜血に加えて便中の*F. nucleatum*を検出することで大腸癌の診断感度、特異度をあげるといった取り組みも既に行われている²⁵⁾。*F. nucleatum*を併用することで、従来の便潜血検査のみよりも感度、特異度をあげることができ、より二次検診への促しがスムーズにいくことが期待されるが、まだ*F. nucleatum*の検出は便からのPCRで行われており、手間やコストも問題もあるため、例えば抗原を検出するキットなどが開発されればより簡便に診断することができるため、そのような診断キットの開発が待たれている。

そしてやはり究極的なゴールは『*F. nucleatum*の除菌による大腸癌予防』であろう。この方策が*H. pylori*除菌による胃癌予防のようにうまくいくかどうかまだ不明である。我々は、歯周病を有する大腸腺腫患者に対してポリプ切除の前後で、歯科での歯周病治療を行い、唾液、便、大腸腺腫における菌叢および*F. nucleatum*の変化を検討した。3か月の歯周病治療で便中の*F. nucleatum*は減少したが、腸内細菌叢や菌叢多様性の変化は認めなかった²¹⁾。この介入により大腸癌リスクが低下するかどうかはまだ不明であり今後更なる検討が必要である。その他に、抗菌薬やプロバイオティクスの投与による腸内細菌への介入の取り組みが行われており、それらの結果も期待して待ちたい。

おわりに

口腔内細菌と大腸癌について、*F. nucleatum*を中心に概説した。大腸がんは本邦をはじめ世界中で罹患患者数、死亡率が増加しており、予防法、治療法の研究が急務である。口腔内細菌、腸内細菌と疾患の研究はまだ途上であり、今後更なる発展が期待される。

謝 辞

本研究に対してご指導賜りました中島淳教授、研究に協力頂きました松浦哲也先生、吉原努先生、小宮靖彦先生、協同乳業 松本光晴先生、臨床研究にご参加頂きました患者さん、そのご家族に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Moore WE, Moore L : Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl Environ Microbiol*, **61** (9) : 3202 – 3207, 1995.
- 2) Yachida S, Mizutani S, Shiroma H, et al. : Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer. *Nature Medicine*, **25** (6) : 968 – 976, 2019.
- 3) Yamaoka Y, Suehiro Y, Hashimoto S, et al. : *Fusobacterium nucleatum* as a prognostic marker of colorectal cancer in a Japanese population. *J Gastroenterol*, **53**: 517 – 524, 2018.
- 4) Mima K, Nishihara R, Qian ZR, et al. : *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut*, **65**: 1973 – 1980, 2016.
- 5) Flanagan L, Schmid J, Ebert M, et al. : *Fusobacterium Nucleatum* Associates With Stages of Colorectal Neoplasia Development, Colorectal Cancer and Disease Outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **33**: 1381 – 1390, 2014.
- 6) Tsai JH, Yang J : Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes & development*, **27** (20) : 2192 – 2206, 2013.
- 7) Rubinstein MR, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han YW : *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe*, **14** (2) : 195 – 206, 2013.
- 8) Kostic AD, Chun E, Robertson L, et al. : *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe*, **14** (2) : 207 – 215, 2013.
- 9) Shi C, Yang Y, Xia Y, et al. : Novel evidence for an oncogenic role of microRNA-21 in colitis-associated colorectal cancer. *Gut*. **65** (9) : 1470 – 1481, 2016.
- 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*,

- 152** (4) : 851–866.e24, 2017.
- 11) Chen Y, Peng Y, Yu J, et al. : Invasive *Fusobacterium nucleatum* activates beta-catenin signaling in colorectal cancer via a TLR 4 /P-PAK 1 cascade. *Oncotarget*, **8** (19) : 31802–31814, 2017.
 - 12) Abed J, Emgård JEM, Zamir G, et al. : Fap 2 Mediates *Fusobacterium nucleatum* Colorectal Adenocarcinoma Enrichment by Binding to Tumor-Expressed Gal-GalNAc. *Cell host & microbe*, **20** (2) : 215–225, 2016.
 - 13) Mima K, Sukawa Y, Nishihara R, et al. : *Fusobacterium nucleatum* and T Cells in Colorectal Carcinoma. *JAMA oncology*, **1** (5) : 653–661, 2015.
 - 14) Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, et al. : Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity*, **42** (2) : 344–355, 2015.
 - 15) Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS : Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*, **11** (2) : 94–100, 2003.
 - 16) Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS : Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. *Nature Reviews Microbiology*, **8** (7) : 471–480, 2010.
 - 17) Takahashi N, Saito K, Schachtele CF, Yamada T : Acid tolerance and acid-neutralizing activity of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiology and Immunology*, **12** (6) : 323–328, 1997.
 - 18) Socransky SS, Haffajee AD : Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*, **28**:12–55, 2002.
 - 19) Komiya Y, Shimomura Y, Higurashi T, et al. : Patients with colorectal cancer have identical strains of *Fusobacterium nucleatum* in their colorectal cancer and oral cavity. *Gut*, **68** (7) : 1335–1337, 2019.
 - 20) Shimomura U, Sugi Y, Kume A, et al. : Strain-level detection of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer specimens by targeting the CRISPR–Cas region. *Microbiology Spectrum*, **11** (6) : e0512322, 2023.
 - 21) Yoshihara T, Kioi M, Baba J, et al.: A prospective interventional trial on the effect of periodontal treatment on *Fusobacterium nucleatum* abundance in patients with colorectal tumours. *Sci Rep*, **11** (1) : 23719, 2021.
 - 22) Ashare A, Stanford C, Hancock P, et al.: Chronic liver disease impairs bacterial clearance in a human model of induced bacteremia. *Clin Transl Sci*, **2** (3) : 199–205, 2009.
 - 23) Abed J, Emgård JEM, Zamir G, et al.: Fap2 Mediates *Fusobacterium nucleatum* Colorectal Adenocarcinoma Enrichment by Binding to Tumor-Expressed Gal-GalNAc. *Cell host & microbe*, **20**(2) : 215–225, 2016.
 - 24) Cueva C, Silva M, Pinillos I, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV : Interplay between Dietary Polyphenols and Oral and Gut Microbiota in the Development of Colorectal Cancer. *Nutrients*, **12** (3) : 625, 2020.
 - 25) Suehiro Y, Sakai K, Nishioka M, et al.: Highly sensitive stool DNA testing of *Fusobacterium nucleatum* as a marker for detection of colorectal tumours in a Japanese population. *Annals of clinical biochemistry*. **54** (1) : 86–91, 2017.

Abstract

TRANSLATIONAL RESEARCH FOCUSING ON THE ORAL AND GUT MICROBIOTA
FOR COLORECTAL CANCER PREVENTION

Takuma HIGURASHI

Department of Gastroenterology and Hepatology, Yokohama City University School of Medicine

The incidence and mortality rates of colorectal cancer in Japan are high, and effective preventive measures are needed. In recent years, numerous studies of the relationship between gut microbiota and colorectal cancer have been conducted, gradually revealing insights into this association. The authors conducted translational research bridging the gap between basic and clinical aspects of gut microbiota and colorectal cancer. This paper provides an overview of our endeavors.

First, we focused on *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), which has been reported to be associated with colorectal cancer and was originally recognized as an oral bacterium related to periodontal disease. It was hypothesized that *F. nucleatum* involved in colorectal carcinogenesis in the colon originates from the oral cavity. Verification of this hypothesis was carried out by isolating *F. nucleatum* from the saliva and colorectal tissues of colorectal cancer patients using cultivation methods. The study showed that *F. nucleatum* was detected in 100% of the oral samples, and of them, 75% shared identical strains with those found in colorectal cancer. This suggests that *F. nucleatum* is of oral origin. Furthermore, a convenient method using the AP-PCR technique was developed for the straightforward examination of identical strains, eliminating the laborious cultivation approach.

Furthermore, targeting patients with periodontal disease for periodontal treatment demonstrated a reduction in the quantity of *F. nucleatum* DNA in feces. This groundbreaking finding implies the potential of preventing colorectal cancer through periodontal disease treatment.

The prospects for further development in this field are promising, and ongoing research is expected to provide more insights.