

# 大腸がん発がん過程における腸内細菌群集構造のダイナミクス

山田拓司

東京工業大学 生命理工学院

株式会社メタジェン

メタジェンセラピューティクス株式会社

株式会社 digzyme

## 略歴：

- a. 出生年、地：1977.8.8, 富山県
- b. 京都大学大学院 理学研究科生物科学専攻 博士課程 研究指導認定退学  
博士（理学） 京都大学
- c. 主な職歴
  - ・平成18年3月 特任助手（京都大学）
  - 平成19年4月 Postdoctoral fellow  
(European Molecular Biology Laboratory)
  - 平成22年4月 Senior Technical Officer  
(European Molecular Biology Laboratory)
  - 平成24年4月 講師（東京工業大学）
  - 平成27年3月 株式会社メタジェン 取締役副社長 CTO（兼任）
  - 平成28年4月 准教授（東京工業大学）
  - 令和元年8月 株式会社 digzyme 取締役（兼任）
  - 令和2年3月 メタジェンセラピューティクス株式会社 CTO（兼任）
- d. 主な研究テーマ  
ヒト腸内環境と疾患の関連研究、  
オミクスデータ可視化手法の開発、  
発酵食品における菌群集構造のダイナミクス解析
- e. 主な受賞歴  
令和2年度 文部科学大臣表彰 科学技術省受賞

## 要約：

### 大腸がんの多段階発がん と腸内細菌

日本では大腸がんによる死亡率が過去30年で著しく増加し、2014年に胃がんを抜いて本邦で最も罹患率の高いがん種となった<sup>1</sup>。大腸がん罹患率は世界でも最も高い国の一つとなっている。食生活習慣の欧米化が原因の一つと考えられているが、そのメカニズムは明らかにされていない<sup>2,3,4</sup>。散発性大腸がんの多くは、大腸ポリープ（腺腫）、粘膜内がんを経て進行がんへと進展する<sup>5,6</sup>。このプロセスは多段階発がんとして知られている。

ヒトの体には約40兆個もの細菌が生息していると言われている<sup>7</sup>。その中でも、ヒトの腸管に生息する腸内細菌は、炎症性腸疾患など様々な腸疾患と関係することが知られ、近

年、注目を集めている<sup>8</sup>。散発性大腸がんでは2012年に、歯周病の原因として知られる口腔内細菌である *Fusobacterium nucleatum* が大腸がん患者の便中に特徴的に多数存在することが報告され<sup>9</sup>、マウス実験により、その発がん機構が次々に明らかになった<sup>10</sup>。その後、次世代シーケンサの発達により、糞便試料を用いた大規模メタゲノム解析が容易になり、次々に新しいがん関連菌が見つかってきている。さらに、腸内細菌の代謝物であるコリバクチンやデオキシコール酸は遺伝毒性であることが以前から知られている<sup>11,12</sup>。

しかしながら、腸内細菌が発がんの原因か結果であるか（または進展に寄与しているのか）については十分に解明されていない。また、食事の傾向や、細菌の栄養源となる腸内の化合物が発がんとのように関係しているかというような全体的な理解は未だ断片的にしか進んでいない。我々のグループでは、この2つの問題を明らかにすることを目指し、大規模なコホートを立ち上げ、大腸がん患者を対象に、糞便試料や、食事等の「生活習慣に関するアンケート」などのデータを収集し、食生活習慣、メタゲノム、メタボロームなどを用いたマルチオミクス解析を行ってきた<sup>13</sup>。ここでは、今までの解析から得られた知見の一部を紹介する。

### 大規模コホートによる日本人の腸内環境の全容解明と大腸がんへの関与

これまでのコホート研究から、大腸がんに関連する細菌がいくつか特定されてきたが、その多くは進行の進んだがん (Stage I/II/III/IV) に関連するもので、大腸ポリープ (腺腫) や、がんのごく初期 (Stage 0) と関連する細菌や代謝物質に関するデータはあまり収集されて来なかった。本研究では、国立がん研究センター・中央病院で大腸内視鏡検査を受けた631被検者 (健常者、多発ポリープ (腺腫)、粘膜内がん (Stage 0)、各ステージのがん (Stage I/II/III/IV)) を対象とし、糞便サンプルを収集した。そのうち、Stage I/II/III の計28患者からは、腫瘍切除の前後で糞便を収集した。また、「生活習慣などに関するアンケート」を用いた調査を実施し、食事や、既知のリスク要因 (年齢、性別、喫煙習慣、飲酒習慣など) も解析の対象とした。その結果、*F. nucleatum* の上昇が、今までのコホート研究で知られていたような Stage I/II/III/IV だけでなく、Stage 0 から上昇し、がんの進行に伴い段階的に上昇することを示した。これは、上記のマウス実験が示しているように、*F. nucleatum* が多段階発がんのごく初期の段階で寄与していることを示唆している。一方、*P. stomatis*, *P. anaerobius*, *P. micra* は Stage I/II、Stage III/IV のグループで占有率の上昇がみられたが、腫瘍切除後に占有率が低下したため、発がんの原因ではなく、腫瘍のある環境に適応する菌であると解釈することができる。我々はさらに、大腸ポリープ (腺腫) や Stage 0 でのみ高い占有率を示す菌 *Atopobium parvulum* と *Actinomyces odontolyticus* を新たに特定した。これらの菌はがんのごく初期に関係する、すなわち発がんの要因の一つである可能性が示唆される。また、酪酸産生菌の *Lachnospira multipara* や *Eubacterium eligens*、*Bifidobacterium longum* は大腸がん患者では低い占有率を示した。

我々のメタボローム解析の結果、大腸ポリープ (腺腫) を有する被験者の糞便中に発がん性の腸内細菌産物であるデオキシコール酸 (DCA) が高い濃度で検出された。DCA は、

腸管内に分泌された一次胆汁酸の一部が特定の腸内細菌の代謝によって生産された二次胆汁酸である。DCA は、以前から、大腸がんと関連が指摘されていたが、ヒトの糞便を用いた網羅的な解析で検証されたことは画期的なことである。

今までの知見から、腸内細菌が免疫様々な機構によってがんの発生や進展に関与していることがわかってきた。特に、*F. nucleatum* は上皮細胞の増殖に関わるシグナル伝達経路やがんの免疫機構に作用することでがんを促進することが示されてきた。我々のコホート研究では、腸内細菌組成や腸内代謝物のプロファイルが、がんの進行に伴いどのように変化するかを観察する為に、大規模なメタゲノムデータ、及びメタボロームデータを収集した。その結果、これまでマウス実験で示されていたような *F. nucleatum* の変化や、デオキシコール酸の上昇が大腸がんのごく初期の段階から起っていることを示した。腸内細菌の発がん機構の研究は、免疫学な側面では研究は進んでいるが、腸内細菌の代謝という生化学的な研究は断片的にしか進んでいない。また、食生活とがんの発症の腸内細菌がどのように関係しているのかという研究は始まったばかりである。我々の大規模マルチオミクス研究は、その第一歩となる。

## 参考文献

1. 国立がん研究センター, がん情報サービス「がん登録・統計」  
[https://ganjoho.jp/reg\\_stat/](https://ganjoho.jp/reg_stat/) (引用 2019/11/21)
2. 国立研究開発法人 国立がん研究センター, 社会と健康研究センター 予防研究グループ  
「食事パターンと大腸がんリスクとの関連について」| 現在までの成果 | 多目的コホート研究 |  
<https://epi.ncc.go.jp/jphc/outcome/7948.html> (引用 2019/11/21)
3. Kolonel, L. N., Altshuler, D. & Henderson, B. E. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 519-527 (2004).
4. Kuriki, K. & Tajima, K. The increasing incidence of colorectal cancer and the preventive strategy in Japan. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **7**, 495-501 (2006).
5. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767 (1990).
6. Vogelstein, B. et al. Cancer genome landscapes. *Science*. **339**, 1546-58 (2013) .
7. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* **14**, e1002533 (2016).
8. Aggeletopoulou, I., Konstantakis, C., Assimakopoulos, S. F. & Triantos, C. The role of the gut microbiota in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Microb. Pathog.* **137**, 103774 (2019).
9. Grivennikov, S. I. et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* **491**, 254-258 (2012).
10. Kostic, A. D. et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* **22**, 292-298 (2012).
11. Arthur, J. C. et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* **338**, 120-123 (2012).
12. Wilson, M. R. et al. The human gut bacterial genotoxin colibactin alkylates DNA. *Science* **363**, eaar7785 (2019).
13. Yachida, S. et al. Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer. *Nat. Med.* **25**, 968-976 (2019).

# Dynamics of the gut microbiome community structure in colorectal carcinogenesis

Takuji Yamada

Tokyo Institute of Technology, Department of Life Science and Technology, Japan

## ● Multi-step colorectal carcinogenesis and gut microbiota

In Japan, the mortality rate from colorectal cancer (CRC) has increased significantly over the past 30 years, and in 2014, CRC surpassed gastric cancer to become the most prevalent cancer type in Japan<sup>1</sup>. Japan is one of the countries with the highest CRC incidences in the world. Westernized dietary habits are considered to be one of the causal factors, but the underlying mechanism has not been clarified<sup>2,3,4</sup>. Most sporadic CRCs develop from polypoid adenomas and are preceded by intramucosal carcinoma, which can progress into malignant forms<sup>5,6</sup>. This developmental process is known as the adenoma–carcinoma sequence.

Roughly 40 trillion bacteria are estimated to inhabit the human body<sup>7</sup>, and disturbances of intestinal bacteria are related to various diseases, such as inflammatory bowel disease<sup>8</sup>. In sporadic cancer cases, *Fusobacterium nucleatum*, a periodontal pathogen, was reported to be associated with non-colitis-associated CRC among cases of sporadic CRC<sup>9</sup>. The underlying mechanisms were studied in mouse models and human cell lines. Later, with the advent of next-generation sequencing technologies that produce large amounts of metagenome data, more CRC-associated gut bacteria were identified<sup>10</sup>. Additionally, some gut bacterial products such as deoxycholic acid and colibactin have been known to be genotoxyc<sup>11,12</sup>.

However, it has not been fully elucidated whether changes in the intestinal microbiota are a cause or a result of carcinogenesis, or whether the microbiota contributes to cancer progression. Current knowledge on the potential links between diet and intestinal residues as a trophic resource for the gut microbiota and carcinogenesis is only fragmental. To address this issue, we established a large human cohort study in Japan, in which we collected fecal samples and a food frequency questionnaire from the same subjects and conducted multi-omics analyses to comprehensively study dietary habits and metagenome and metabolome data in relation to CRC<sup>13</sup>. Here we introduce some of the knowledge we obtained from our study.

## ● The intestinal microbiota and its involvement in colorectal cancer in a Japanese population

Large cohort studies have identified several bacteria and their metabolites that are associated with CRC, mostly in stage I–IV cases; however very limited data are available for intramucosal carcinoma (stage 0), the very early stage of CRC. In order to address these challenges, we have established a large Japanese cohort, where we collected fecal samples from 631 participants, including patients with multiple polypoid adenomas, intramucosal carcinoma (stage 0), stages I–IV, and healthy controls,

undergoing colonoscopy check at the National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan<sup>13</sup>. From 28 of these patients in stages I–III, fecal samples were collected before and after surgical tumor resection. In addition, data on lifestyle were obtained from a detailed questionnaire which includes questions on food frequency as well as known CRC risk factors (age, sex, smoking habits, and alcohol consumption). Firstly, we found that *F. nucleatum* abundance was significantly elevated continuously from stage 0 to more advanced stages. This suggests that *F. nucleatum* contributes in the very early stage of the adenoma-carcinoma sequence, which was in line with the above-mentioned findings in mouse models and human cell lines. On the other hand, *P. anaerobius*, *P. stomatis*, and *P. micra* were predominantly enriched in stage I/II and stage III/IV, and their abundances decreased after tumor resection, which implies that these species might not cause carcinogenesis, but are adapted to the cancerous environment. Secondly, we found that *Atopobium parvulum* and *Actinomyces odontolyticus*, whose relative abundances were higher than those of other CRC-associated bacteria, were significantly increased in multiple polypoid adenomas and/or in stage 0, but were not increased as significantly in more advanced stages. Thirdly, butyrate producers (i.e., *Lachnospira multipara* and *Eubacterium eligens*) and *Bifidobacterium longum* were depleted in several CRC stages.

A metabolome analysis in our Japanese cohort study displayed higher concentrations of DCA in the feces of patients with multiple polypoid adenomas. The findings in the above-mentioned studies and ours support that DCA might be involved in very early carcinogenesis. DCA is a secondary bile acid produced by a specific group of gut bacteria. Primary bile acids are generated from cholesterol in the liver and secreted into the intestine. A number of animal studies in the past few decades have shown the carcinogenic effect of DCA in gastroenterological organs. It is of great importance that this was also verified by in human feces.

Previous findings have revealed that intestinal bacteria are involved in the development and progression of CRC through various mechanisms. In particular, *F. nucleatum* has been shown to promote cancer by acting on signal transduction pathways involved in epithelial cell proliferation and cancer immune mechanisms. In our large-scale cohort study, we collected metagenome and metabolome data to evaluate how the intestinal microbial composition and metabolomic profile change as CRC progresses. We showed that CRC-associated bacteria (e.g., *F. nucleatum*) and microbial metabolites (e.g., DCA) are increased at CRC onset. Immunological studies have largely elucidated the carcinogenic mechanisms of gut microbiota, whereas biochemical research on their metabolites and the carcinogenic effects thereof is limited. Furthermore, research on how dietary habits are related to the intestinal bacteria that promote cancer development has just begun. Further metagenome and metabolome studies might provide answers to these questions.

## References

1. 国立がん研究センター, がん情報サービス「がん登録・統計」  
[https://ganjoho.jp/reg\\_stat/](https://ganjoho.jp/reg_stat/) (引用 2019/11/21)
2. 国立研究開発法人 国立がん研究センター, 社会と健康研究センター 予防研究グループ  
「食事パターンと大腸がんリスクとの関連について」| 現在までの成果 | 多目的コホート研究 |  
<https://epi.ncc.go.jp/jphc/outcome/7948.html> (引用 2019/11/21)
3. Kolonel, L. N., Altshuler, D. & Henderson, B. E. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 519-527 (2004).
4. Kuriki, K. & Tajima, K. The increasing incidence of colorectal cancer and the preventive strategy in Japan. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **7**, 495-501 (2006).
5. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767 (1990).
6. Vogelstein, B. et al. Cancer genome landscapes. *Science*. **339**, 1546-58 (2013) .
7. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* **14**, e1002533 (2016).
8. Aggeletopoulou, I., Konstantakis, C., Assimakopoulos, S. F. & Triantos, C. The role of the gut microbiota in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Microb. Pathog.* **137**, 103774 (2019).
9. Grivennikov, S. I. *et al.* Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* **491**, 254-258 (2012).
10. Kostic, A. D. *et al.* Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* **22**, 292-298 (2012).
11. Arthur, J. C. *et al.* Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* **338**, 120-123 (2012).
12. Wilson, M. R. *et al.* The human gut bacterial genotoxin colibactin alkylates DNA. *Science* **363**, eaar7785 (2019).
13. Yachida, S. *et al.* Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer. *Nat. Med.* **25**, 968-976 (2019).