

胃内細菌による粘膜免疫・発癌制御機構の解明と治療応用

早河 翼

東京大学医学部附属病院 消化器内科

【研究の背景】

ヘリコバクター・ピロリ菌感染は胃癌の最大のリスク因子であるが、抗生剤による除菌治療と衛生環境の改善により感染率が低下し、胃癌発症数も低下傾向である。しかしながら、ピロリ菌除菌後に胃癌を発症する患者（除菌後胃癌）が高頻度に存在し、除菌後の適切な予防・治療戦略が求められている。この medical needs に対して、これまでに申請者らは胃内細菌叢に着目して研究を行ってきた。胃酸の存在する胃粘膜内にはピロリ菌などのウレアーゼを産生する特殊な細菌を除き生息が困難であると考えられてきたが、近年の網羅的細菌叢解析の結果から、慢性胃炎患者や胃酸分泌抑制剤内服中などの胃酸が少ない環境下においては、多彩な細菌が胃内に定着していることが明らかになってきた。

申請者らはこれまでに 288 人の Hp 除菌後胃炎患者からの内視鏡生検検体を用い、16srRNA シークエンスを用いて胃内細菌叢を解析した。その結果、*Fusobacterium* 属、*Neisseria* 属を含む細菌叢の集団においてその後の胃癌発生率が、その他の細菌叢の患者と比べて有意に高いことを明らかにした。*Fusobacterium* 属、*Neisseria* 属と胃癌細胞株の共培養系において多彩な炎症性サイトカイン・ケモカインの発現が誘導されること、さらに、マウスモデルを用いた解析により、胃内細菌が特定の免疫細胞の胃粘膜内への誘導に重要であることから、異常細菌叢の増生 (Dysbiosis) と宿主免疫応答が密接な相互作用を介しながら発癌変化を惹起することを見出した。一方で、*Bifidobacterium*・*Bacteroides* 属細菌を有する胃炎患者は発癌がほぼ認められず、さらにこれらの菌種はマウス胃炎モデルにおいて胃癌を抑制する B 細胞の増生を引き起こすことが分かった。以上より、胃内細菌とそれに対する宿主側免疫応答のメカニズムを詳細に解析し、これを制御することによって、除菌後胃癌の発生をゼロに近づけることが可能だと考えている。

【目 的】

本研究では、これまでの解析結果を発展させ、ピロリ菌陰性時代に胃癌を引き起こす第二の原因菌を同定し、非ピロリ胃内細菌と宿主免疫応答による発癌制御機構を解明することで、新時代の胃癌予防・治療法を確立することを目的とする。免疫チェックポイントに関連する応答を含む宿主免疫系と胃内細菌群との関連を解析し、その機序を解明することによって、最終的に胃癌に対する免疫チェックポイント阻害療法の効果増強や、癌死亡を減少させることを目指す。

【方 法】

申請者らが施行したヒト胃炎粘膜の 16srRNA シークエンスにより同定され、単離培養された菌種のうち、高発癌リスク患者群で増加する *F. nucleatum*, *N. subflava* を、慢性胃炎～胃癌を自然発症するマウスモデルである胃特異的 IL1b 過剰発現マウスへ経口菌移植し、炎症・発癌への影響を解析する。当該細菌を経口感染させたマウス胃粘膜の病理学的解析、遺伝子・蛋白発現解析、メタボローム解析を施行し、それぞれの菌種が引き起こす胃粘膜内の分子学的変化を網羅的に解析する。In vitro の解析として胃癌細胞株・3次元オルガノイドを用い、細菌および菌体成分・細菌由来代謝物との共培養を行い、細胞増殖・遺伝子蛋白発現・代謝状態への変化を観察する。これにより、ヒト胃粘膜で同定された各胃内細菌が、胃内の炎症と発癌に与える影響を明らかにする。

上記細菌による胃内の宿主免疫細胞の分画変化を、感染後マウスの FACS・免疫染色にて網羅的に把握する。胃炎から

の発癌を促進・抑制する、骨髄球・Mast 細胞・自然リンパ球・樹状細胞・B 細胞・IgA 産生細胞などに対する細菌の影響を解析する。

【結 果】

胃癌細胞株を用いた in vitro の共培養実験により、胃上皮内シグナル伝達経路である NF- κ B 経路と MAPK/SRE 経路について、その活性をルシフェラーゼアッセイにより検証した。Dysbiosis グループの胃内細菌である *Fusobacterium nucleatum*・*Neisseria subflava*・*Neisseria cinerea*・*Streptococcus mitis*・*Haemophilus parainfluenzae*・*Delftia Acidovorans*、および *H.pylori*・*E.coli* をそれぞれ共培養したところ、*F. nucleatum*・*N. subflava*・*N. cinerea* 共培養時において、*H.pylori* 共培養時と同等以上の胃癌細胞中の NF- κ B・SRE 活性化を認めた。一方、その他の細菌共培養時には両経路の活性化は認められなかった。以上より、*Fusobacterium*・*Neisseria* 属細菌に着目して以後検討を進めた。

高精度顕微鏡観察と FACS 解析の結果、*Fusobacterium* は胃癌細胞に直接接着することで細胞内シグナル伝達経路の活性化を誘導していた。一方 *Neisseria* は直接結合能は有さず、上清への分泌物などを介して上皮内の反応を誘発していることがわかった。*Fusobacterium* の接着機能・シグナル活性化機構は、胃のムチンを形成する糖鎖成分の存在下で抑制されたことから、正常の胃ムチンは胃内細菌からの防御能を有している可能性が示唆された。

H.pylori・*F. nucleatum*・*N. subflava* と共培養後の上皮細胞 RNA を用いて RNAseq より網羅的に解析した結果、*Neisseria* は多彩なケモカイン・サイトカインの遺伝子発現の誘導を引き起こして炎症反応の活性化を誘導することがわかった。その中で、CCL2/5/20/28、Cxcl1/2/3/5/10、Il1a/1b/17c の誘導効果が両細菌で顕著であり、*Fusobacterium* は Pdl1 の誘導効果が認められた。胃炎マウスモデルへの *Fusobacterium*・*Neisseria* 経口菌移植実験の結果、対照群と比較して移植群では F4/80+マクロファージ、CD11c+樹状細胞、CD3+T 細胞、CD19+B 細胞、IgA+細胞の増加が認められ、胃粘膜の遺伝子発現解析でも in vitro の検討と矛盾しない免疫関連遺伝子の変動を認めた。

Fusobacterium は、RNAseq 解析の結果炎症惹起作用に加え DNA 障害や p53 経路の活性化作用がより顕著であった。そのため、二重鎖 DNA 切断のマーカーである γ H2AX の発現を共培養後に観察したところ、*Fusobacterium* と *H.pylori* は DNA 障害を誘導することが分かった。さらに、メタボローム解析によって *Fusobacterium*・*Neisseria* の培養上清成分を解析したところ、*Fusobacterium* の上清中に特異的に含まれる Mesaconic acid と N-Acetylmuramic acid が DNA 障害作用を有することが分かった。障害後のマウス胃粘膜では代償的に細胞増殖が亢進しており、*Fusobacterium* による腫瘍促進効果が示唆された。

ヒト胃炎サンプルで免疫細胞の浸潤を免疫染色で解析したところ、マウスと同様に *Fusobacterium*/*Neisseria* を有する症例ではマクロファージ・リンパ球数の上昇を認め、PD-L1/PD-1 の発現も増加していた。また、*Fusobacterium* 陽性症例では、p53 遺伝子変異の頻度がより高く、ヒトサンプルでの変異原性と腫瘍促進作用の可能性が示唆された。以上、マウスモデル・ヒトサンプルの解析結果より、特定の胃内細菌(特に *Fusobacterium*・*Neisseria*)が胃粘膜の免疫反応を制御し、その後の発癌や腫瘍免疫に関与している可能性が示された。

【考 察】

これまで胃内に生息する細菌はピロリ菌を含む数種類に限られると考えられ、過去のほとんどすべての胃癌研究はピロリ菌を中心に行われてきた。しかしながら、ピロリ菌除菌後発癌の原因として、慢性胃炎・腸上皮化生患者の胃粘膜における細菌叢研究が近年盛んにおこなわれており、結果として胃酸分泌が低下している慢性胃炎粘膜では多彩な細菌が生息していることが分かってきた。実際、申請者らの独自の解析においてもヒトピロリ除菌後胃粘膜から多彩な胃内細菌が検出されている。

現時点では、これらの非ピロリ胃内細菌の機能や、胃内免疫応答や発癌に与える影響はほとんど解明されていないが、本研究では胃内細菌が好中球分画・B 細胞・IgA 産生細胞などとの相互作用を有し、結果として胃炎・発癌へ影響を及ぼすことをマウスモデル・ヒトサンプルの解析において明らかにすることができた。*Fusobacterium*・*Neisseria* 以外の細菌群と宿主反応・発癌への影響については、今後の検討課題と言える。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

解析の結果から、各種細胞群が特定のサイトカインを産生することで、胃炎促進的ないし防御的な働きを発揮することが示唆されており、より詳細なメカニズム解析へつなげることができた。将来的には、各細胞分画を刺激する特定の細菌群を同定することで、これらの細菌叢制御を通じて宿主免疫応答を変化させ、癌になりにくい胃内環境を整備することを狙っていききたい。こうした Probiotic な胃内細菌制御により宿主の免疫応答を調節することで、持続可能な胃癌リスク軽減を果たす新規癌予防アプローチの開発へつなげると期待される。