

Fusobacterium nucleatum as a prognostic marker of colorectal cancer in a Japanese population

(日本人におけるフソバクテリウム・ヌクレアタムの大腸癌の予後マーカーとしての有用性)

氏名 山岡 祐子
所属 山口大学大学院医学系研究科
医学専攻
消化器内科学講座

令和 2年 1月

目次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	2
3. 目的	2
4. 方法	3
(1) 対象	3
(2) 方法	5
(3) 統計解析	6
5. 結果	7
6. 考察	12
7. 結語	14
8. 謝辞	14
9. 参考文献	15

1. 要旨

【背景】過去の研究で大腸腫瘍の組織中にフソバクテリウム・ヌクレアタムが多く存在することが明らかとなった。しかし過去の報告では腫瘍組織中のフソバクテリウム・ヌクレアタムのコピー数と大腸癌の予後との関連は明らかではなかった。そこで我々は組織中フソバクテリウム・ヌクレアタムの有無と大腸癌の臨床病理学的、分子学的特徴を比較検討する研究を行った。【方法】癌患者100例の大腸癌組織とマッチさせた癌患者72例の正常粘膜組織を選定し、droplet digital PCR (ddPCR)によってフソバクテリウム・ヌクレアタムのコピー数を測定した。【結果】フソバクテリウム・ヌクレアタムの検出率は正常粘膜組織で63.9% (46/72)、大腸癌組織で75% (75/100)であった。フソバクテリウム・ヌクレアタムのコピー数の中央値は正常粘膜組織で0.4/ng DNA、大腸癌組織で1.9/ng DNAであった ($p=0.0031$)。ステージIVのフソバクテリウム・ヌクレアタムのコピー数は正常粘膜組織中のコピー数より有意に高かった ($p=0.0016$)。大腸癌組織のフソバクテリウム・ヌクレアタムの有無は腫瘍径とKRAS変異と相関し、全生存期間の短縮と有意に相関した。特にステージIVではこの傾向は顕著であった。正常粘膜組織に着目するとステージI～IIIと比較してステージIVで有意にフソバクテリウム・ヌクレアタムコピー数が多かった。【結論】フソバクテリウム・ヌクレアタムの測定は大腸癌患者の臨床予後予測の一助となり得る。

2. 研究の背景

現在までの検証でフソバクテリウム・ヌクレアタムが腫瘍原性遺伝子や炎症性遺伝子を活性化させることで大腸癌の発生と進展において重要な役割を果たしていると考えられている[1-6]。フソバクテリウム属は無孢子嫌気性グラム陰性菌でヒトの口腔内常在菌である。フソバクテリウム属には様々な種類があり、いくつかは日和見感染により歯周炎[7-9]、炎症性腸疾患[10-12]、膵膿瘍[13, 14]、肝膿瘍[14-16]などの原因となる。大腸癌組織からフソバクテリウム・ヌクレアタムが検出されたという報告も存在する[2, 3, 17-19]。フソバクテリウム・ヌクレアタムは少なくとも2種類の 방법으로大腸癌組織に結合する。1つはFadA pathwayであり、FadAはフソバクテリウム・ヌクレアタムの表面に発現する接着分子である[20-22]。FadAが大腸粘膜細胞表面のE-カドヘリンと結合することでフソバクテリウム・ヌクレアタムはFadAを介して大腸粘膜細胞に接着し侵入する[1]。

もう1つはフソバクテリアの糖鎖結合蛋白(Gal-GalNAC-binding lectin(Fap2)) pathwayであり、Abetら[5]は大腸癌に過剰に発現する宿主の多糖類であるGal-GalNacをフソバクテリアのFap2が認識することを報告している。彼らはフソバクテリアが口腔内を起源として大腸癌に移行すると考えている[5]。なぜならフソバクテリアは主にヒトの口腔内に常在する細菌であり、消化管に存在するのはまれであるからである[12, 23-25]。そして一時的な菌血症は歯磨きの15分後に血中の細菌数が 10^4 /mlに達するような歯周病に伴ってよく起こる[26]。

これらの過去の研究をみると、大腸癌に存在するフソバクテリウム・ヌクレアタムは予後マーカーとなり得る。しかし過去の研究ではフソバクテリウム・ヌクレアタムの量的比較のために量的リアルタイムPCRを使用しているため、少量のフソバクテリウム・ヌクレアタムの検出が難しい。この研究では我々は日本人においての大腸癌組織中のフソバクテリウム・ヌクレアタム数と大腸癌の臨床病理学的、分子学的特徴を比較検討するため、量的リアルタイムPCRより1000倍感度が高いdigital PCRを使用している[27]。

3. 目的

過去の研究で大腸腫瘍の組織中にフソバクテリウム・ヌクレアタムが多く存在することが明らかとなったが、過去の報告では腫瘍組織中のフソバクテリウム・ヌクレアタムのコピー数と大腸癌の予後との関連は明らかではなかった。そこで我々は組織中フソバクテリウム・ヌクレアタムの有無と大腸癌の臨床病理学的、分子学的特徴を比較検討する研究を行った。

4. 方法

(1) 対象

1999年4月から2008年5月までに、当院第二外科において外科治療をうけた原発性大腸癌の患者100例に対して検討を行った。100例の原発性大腸癌組織と同じ患者の切除マージンから採取した72例の正常粘膜組織をすぐに液体窒素により凍結し-80℃で保存した。100例の大腸癌患者の内、28例は正常粘膜組織が採取できなかった。DNAはAllPrep DNA/RNA Mini kit(QIAGEN, Hilden, Germany)によって分離した。DNAの量的測定はQubit 2.0 fluorometers(Thermo Scientific, 横浜, 日本)によって行った。ステージ分類は国際対がん連合(UICC)に従って行った[28]。症例は51例の男性と49例の女性を含んでいた。大腸癌のステージはステージIが14例、ステージIIが36例、ステージIIIが30例、ステージIVが20例であった(表1)。ステージIVの患者の内、1例は治癒切除が行われ18例は非治癒切除、1例は不明であった(表2)。この研究は山口大学医学部附属病院の倫理審査委員会の認証を得ており(認証番号:H26-110)、研究に参加する前に各患者から検査に対する同意を得ている。

表 1. フソバクテリウム・ヌクレアタム高値と低値での患者の臨床病理学的、分子学的特徴

	大腸癌組織中の フソバクテリウム・ヌクレアタム量		
	フソバクテリウム・ ヌクレアタム高値	フソバクテリウム・ ヌクレアタム低値	p
年齢(平均±SD)	67.0±10.0	66.1±12.8	0.697
性別			
男性	26	25	0.841
女性	24	25	
腫瘍部位			
右	21	14	0.142
左	29	36	
腫瘍径(平均±SD)	57.7±25.7	44.6±22.1	0.004
pT			
1	1	7	0.158
2	4	5	
3	38	32	
4	7	6	

pN			
0	23	32	0.107
1または2	27	18	
M			
0	37	43	0.134
1	13	7	
pStage			
I	3	11	0.071
II	17	19	
III	17	13	
IV	13	7	
腫瘍分化度			
高分化	16	13	0.791
中分化	28	32	
低分化	2	1	
その他	4	3	
KRAS			
変異型	25	13	0.016
野生型	24	35	
不明 (n=3)			
hMLH1			
メチル化	4	5	0.751
非メチル化	45	45	
不明 (n=1)			
正常粘膜組織中の フソバクテリウム・ヌクレアタム			
中央値copies/ng DNA (range, n)	2.55 (0-89.4, n=34)	0 (0-25.9, n=38)	<0.001

フソバクテリウム・ヌクレアタム高値 : >1.9 copies/ng DNA

フソバクテリウム・ヌクレアタム低値 : ≤1.9 copies/ng DNA

表 2. フソバクテリウム・ヌクレアタム高値と低値でのステージIV患者の臨床病理学的、分子学的特徴

	大腸癌組織中の フソバクテリウム・ヌクレアタム量		
	フソバクテリウム・ ヌクレアタム高値	フソバクテリウム・ ヌクレアタム低値	p
年齢 (平均±SD)	62.5±9.8	63.9±14.5	0.954

性別			
男性	8	3	0.423
女性	5	4	
腫瘍部位			
右	8	2	0.160
左	5	5	
腫瘍径(平均±SD)	66.8±34.4	57.1±21.1	0.831
腫瘍分化度			
高分化	1	2	0.579
中分化	9	4	
低分化	1	0	
その他	2	1	
外科的治癒度			
治癒	0	1	0.179
非治癒	12	6	
不明(n=1)			
KRAS			
変異型	6	2	0.444
野生型	7	5	
hMLH1			
メチル化	1	1	0.683
非メチル化	11	6	
不明(n=1)			
正常粘膜組織中の フソバクテリウム・ヌクレアタム			
中央値copies/ng DNA(range, n)	5.6(0-89.4, n=10)	0.7(0.2-3.5, n=3)	0.168

フソバクテリウム・ヌクレアタム高値 : >1.9 copies/ng DNA

フソバクテリウム・ヌクレアタム低値 : ≤1.9 copies/ng DNA

(2) 方法

Droplet digital PCRによるフソバクテリウム・ヌクレアタムコピー数の解析

我々はフソバクテリウム・ヌクレアタムのコピー数の解析にdroplet digital PCR(ddPCR)を用いた[29]。PCR反応はDNA 20ng、1×ddPCR Supermix for Probes(BioRad, Hercules, CA, USA)、プライマー0.25μM、プローブ0.125μMを合計22μLとし、滴下溶液としてautomated droplet generator(BioRad)を使用し

た。フソバクテリウム・ヌクレアタムのプライマーとプローブの塩基配列は以下のとおりである[30]。

forward primer, 5' -AAGCGGTCTAGGTGGTTATGT-3'

reverse primer, 5' -TGTAGTTCCGCTTACCTCTCCAG-3'

probe, 5' -FAM-CAACGCAATACAGAGTTGAGCCCTGCATT-TMARA-3'

PCRによるアンプリコン長はNCBI reference sequence

NC_003454.1 (fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum ATCC 25586

chromosome, complete genome) の730429から730536までの108塩基対である。

PCRサイクルの条件は10分95°Cの前加熱、30秒94°Cの変性と60秒60°Cのアニーリングを40サイクル、10分98°Cの後加熱で行った。アンプリケーションの後、PCRプレートはQX100 droplet reader (BioRad)に装着し蛍光振幅はQuantaSoft software (BioRad)により記録した。

KRAS変異

DNAダイレクトシーケンスはKRAS(コドン12, 13)のエクソン3変異を検出することで行った[31]。

hMLH1メチル化

hMLH1のメチル化状態はメチル化特異的PCRによるDNAバイサルファイト処理によって決定した[31]。

(3) 統計解析

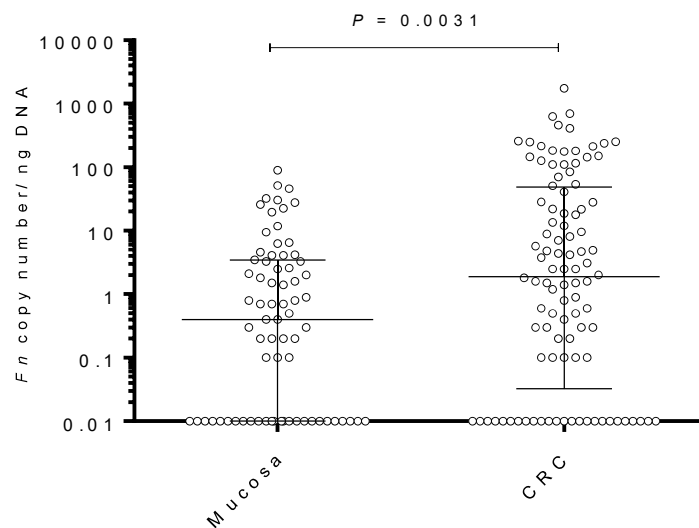
データ分析はGraphPad InStat Ver. 3, GraphPad Prism Ver. 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)、STATA13 statistical software (StataCorp LP, College Station, TX, USA)を用いて行った。Mann-Whitney U検定、Fisher's exact検定、Wilcoxon matched-pairs signed rank検定、Kruskal-Wallis検定を用いた。生存確率はKaplan-Meier法によって計算し、統計学的有意差はlog-rank検定を用いた。追跡期間は2016年6月30日までとした。P値は<0.05を統計学的に有意差ありと定めた。

5. 結果

大腸癌組織のフソバクテリウム・ヌクレアタム数

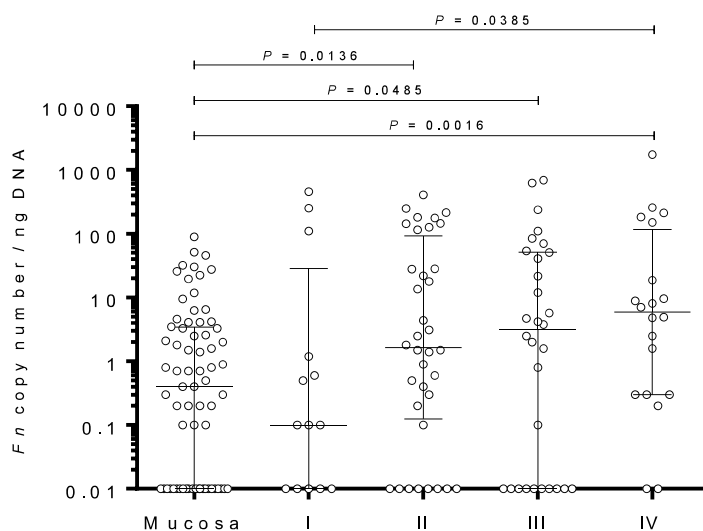
フソバクテリウム・ヌクレアタムの検出率は正常粘膜組織で63.9% (46/72)、大腸癌組織で75% (75/100)であった。フソバクテリウム・ヌクレアタムのコピー数は患者の正常粘膜組織より大腸癌組織で有意に高かった ($p=0.0031$, Mann-Whitney U検定) (図1)。フソバクテリウム・ヌクレアタムのコピー数の中央値は大腸癌組織で1.9/ng DNA、正常粘膜組織で0.4/ng DNAであった。72例の大腸癌組織と同一の72例の正常粘膜組織の検討でも同様の結果であり、フソバクテリウム・ヌクレアタムのコピー数の中央値は大腸癌組織で1.6/ng DNA、正常粘膜組織で0.4/ng DNAであった ($p=0.0046$, Wilcoxon matched-pairs signed rank検定)。正常粘膜組織とステージI~IVの大腸癌組織のフソバクテリウム・ヌクレアタム数には統計学的に有意差を認めた ($p=0.0091$, Kruskal-Wallis検定)。正常粘膜組織とステージIVの大腸癌組織のフソバクテリウム・ヌクレアタム数には特に相関を認めた (中央値0.4, 中央値5.95 copies/ng DNA, $p=0.0016$) (図2)。

図1. 正常粘膜組織と大腸癌組織のフソバクテリウム・ヌクレアタム数の比較



各サンプルは○によって示されている。横線は中央値と四分位数範囲 (25パーセントイルと75パーセントイル) を示している。

図2. 正常粘膜組織とステージ毎の大腸癌組織のフソバクテリウム・ヌクレアタム数の比較

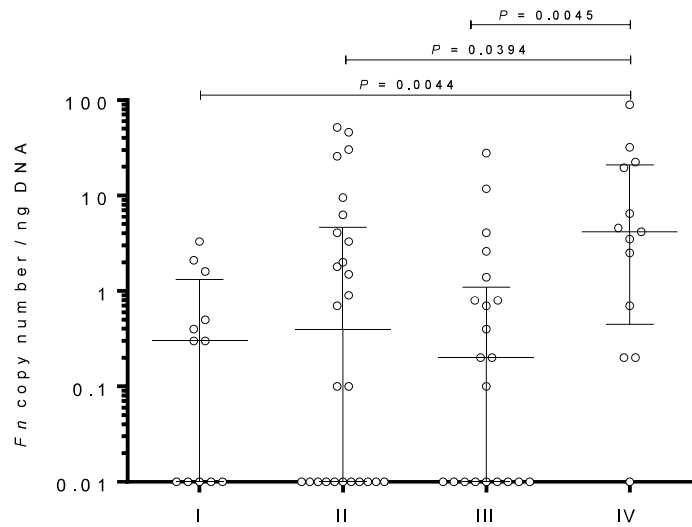


各サンプルは○によって示されている。横線は中央値と四分位数範囲（25パーセントイルと75パーセントイル）を示している。

正常粘膜組織のフソバクテリウム・ヌクレアタム数の比較

大腸癌患者のステージ毎の正常粘膜組織のフソバクテリウム・ヌクレアタム数に統計学的有意差は認めなかった ($p=0.0221$, Kruskal-Wallis検定)。図3はステージIV（中央値4.2 copies/ng DNA）の正常粘膜組織がステージI（中央値0.3 copies/ng DNA, $p=0.0044$ ）、ステージII（中央値0.4 copies/ng DNA, $p=0.0394$ ）、ステージIII（中央値0.2 copies/ng DNA, $p=0.0045$ ）の正常粘膜組織と比較して有意にフソバクテリウム・ヌクレアタム数が高いことを示している。

図 3. 大腸癌患者のステージ毎の正常粘膜組織のフソバクテリウム・ヌクレアタム数



各サンプルは○によって示されている。横線は中央値と四分位数範囲（25パーセントイルと75パーセントイル）を示している。

大腸癌組織フソバクテリウム・ヌクレアタム数と臨床病理学的、分子学的特徴の比較

先の研究ではフソバクテリウム・ヌクレアタム量を高値と低値に分けるために中央値を用いていた[2, 4, 32]。我々はフソバクテリウム・ヌクレアタム量と臨床病理学的、分子学的特徴を、先の研究と比較検討するため、大腸癌組織のフソバクテリウム・ヌクレアタム中央値1.9 copies/ng DNAによってフソバクテリウム・ヌクレアタム高値群 (>1.9 copies/ng DNA) とフソバクテリウム・ヌクレアタム低値群 (≤ 1.9 copies/ng DNA) に分けた。2つの群の臨床病理学的、分子学的特徴は表1にまとめている。フソバクテリウム・ヌクレアタム高値群は低値群と比較してより腫瘍径が大きく ($p=0.004$)、KRAS変異がより高頻度であった ($p=0.016$)。フソバクテリウム・ヌクレアタム高値群と低値群にhMLH1メチル化に有意差はなかった ($p=0.751$)。

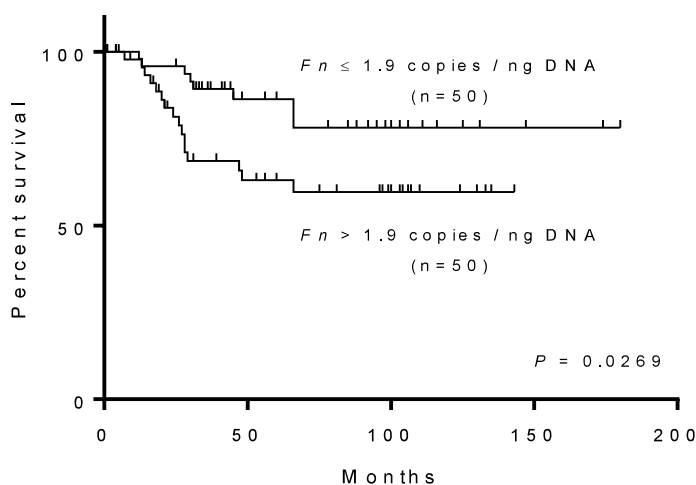
フソバクテリウム・ヌクレアタム数と患者の予後の比較

大腸癌組織のフソバクテリウム・ヌクレアタム数のlog-rank検定による全生存期間のKaplan-Meier表を図4aに示す。フソバクテリウム・ヌクレアタム高値の患者は低値の患者と比較して有意に全生存期間が短かった ($p=0.0621$, 図4b)。我々はステージIVの患者の生死を判別する最適なカットオフ値を求めるためROC曲線による分析も行った。図5aに示す通り、ROC曲線の面積は0.83であり生死を

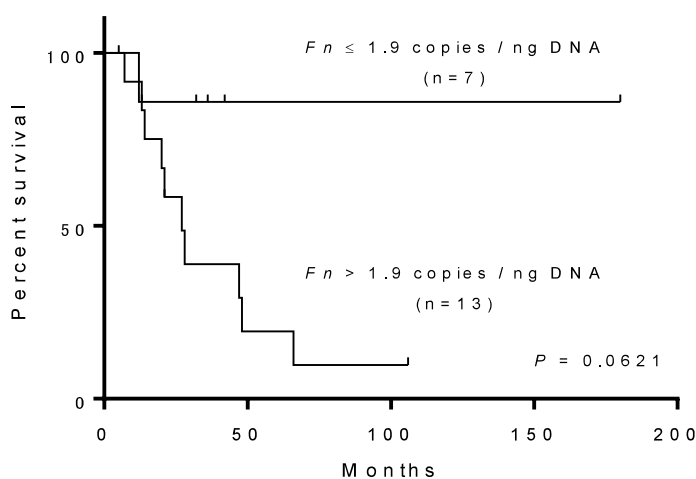
判別する最適なフソバクテリウム・ヌクレアタム数のカットオフ値は4.9 copies/ng DNAであった。カットオフ値4.9 copies/ng DNAでの感度は90.9% (95% CI 68.7-99.3%)、特異度は88.9% (95% CI 66.4-98.6%)であった。カットオフ値4.9 copies/ng DNAよりフソバクテリウム・ヌクレアタム数が多いステージIVの患者では4.9 copies/ng DNA以下の患者と比較して全生存期間が短かった (p=0.0415, log rank検定, 図5b)。

図4. 全生存期間のkaplan-Meier表

a. 全ステージの患者の全生存期間

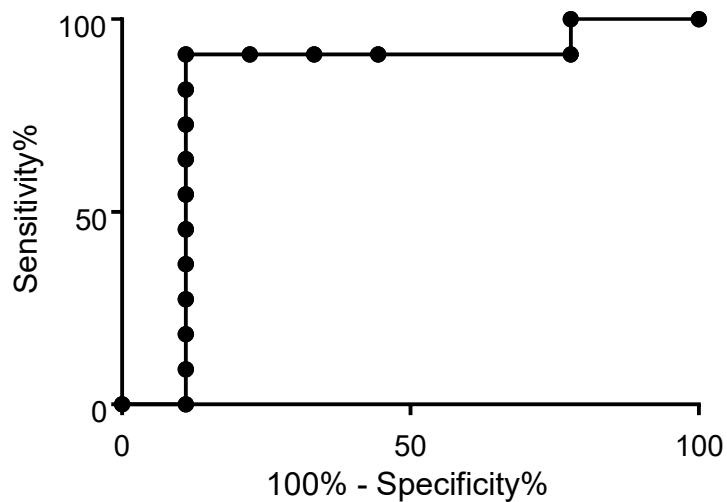


b. ステージIVの患者の全生存期間

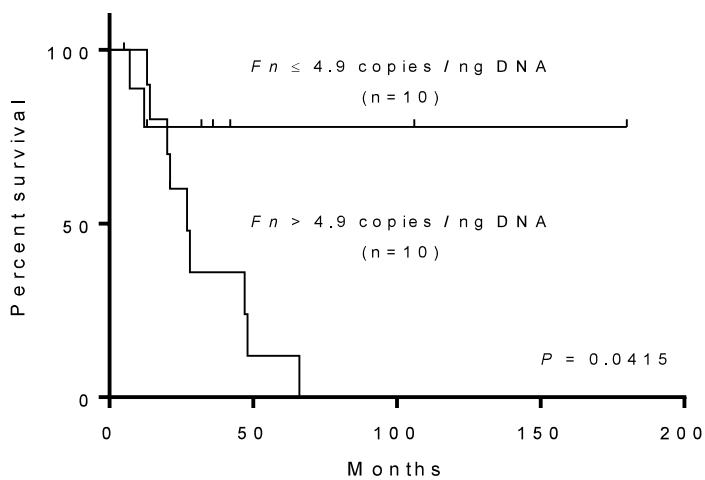


患者はフソバクテリウム・ヌクレアタム数中央値1.9 copies/ng DNAによって2つの群に分けている。

図5. 最適なカットオフ値によるステージIV患者の全生存期間のkaplan-Meier表
 a. ステージIV患者の生死を判別する最適なカットオフ値を求めるためのROC曲線



b. 最適なカットオフ値4.9 copies/ng DNAにより2つの群に分けた log rank検定を用いたkaplan-Meier表



6. 考察

この研究においても過去の研究と同様に、大腸癌患者の癌組織では正常粘膜組織と比較して、よりフソバクテリウム・ヌクレアタム数が多いことがわかった[1-6]。またフソバクテリウム・ヌクレアタム数低値の大腸癌組織よりフソバクテリウム・ヌクレアタム数高値の大腸癌組織の患者でより腫瘍径が大きく、全生存期間が短かったことが分かり、これも以前の研究と同様の結果であった[2, 4, 33]。本研究ではステージⅣの患者のフソバクテリウム・ヌクレアタム数と全生存期間の短縮の関係がわかったが、ステージⅣにおいてフソバクテリウム・ヌクレアタム数が予後マーカーとなり得ることは世界初の知見である。ステージⅣの予後マーカーとしては広汎な肝転移（H因子）、リンパ節転移（pN因子）、腹膜転移（P因子）が予後不良と関連すると報告されている[34]。しかしながら我々の検討ではこれらの因子と患者の予後は相関しなかった（データ非公開）。対して、ステージⅣの患者ではフソバクテリウム・ヌクレアタム数のみが予後予測因子であった。我々はまた、ステージⅠ～Ⅲの患者の正常粘膜組織と比較してステージⅣの患者の正常粘膜組織で有意にフソバクテリウム・ヌクレアタム数が多いことがわかった。これもまた大腸癌患者の正常粘膜組織のフソバクテリウム・ヌクレアタム数と大腸癌患者のステージを比較した初めての報告である。倫理的な問題からコントロールとして組織を採取するために健常者のボランティアを募集することはできなかつたため健常者の正常粘膜組織のフソバクテリウム・ヌクレアタム数は検証できなかつた。しかしながら、Rubinsteinらは癌のないコントロール（良性大腸疾患による切除や隣接臓器の切除を行った患者）の正常大腸粘膜組織のフソバクテリウム・ヌクレアタム数が前癌腺腫患者の正常組織や腺腫組織そして癌患者の正常組織や癌組織より低いことを報告している。その差は大きく、癌のないコントロールと大腸癌では $a > 2 \log$ の差がある[1]。ゆえに我々は健常者のコントロールの正常粘膜組織のフソバクテリウム・ヌクレアタム数はわずかであると推測している。

別の研究ではフソバクテリウム・ヌクレアタム数が多いほど大腸癌中のCD3⁺濃度が低いという報告がある[35]。また大腸癌中のCD3⁺pan-T cellとT-cell subpopulationの濃度が高いほど予後が良いとの報告もあり[36]、フソバクテリウム・ヌクレアタム数高値はCD3⁺T-cell依存性腫瘍免疫を抑制し、ゆえに大腸癌患者、特にステージⅣ患者の予後に影響すると考えられる。フソバクテリアはヒトの口腔内常在菌であるが消化管に存在する頻度は低い[5]。ゆえにどのようにしてフソバクテリウム・ヌクレアタムが正常粘膜や大腸癌組織を含めた大腸組織に移動するかという疑問がある。この疑問の答えとして、AbedらはFap2依存性経路によって経静脈的にマウスの腫瘍組織に感染すると報告しており、フソバクテリアは血行性に大腸癌に到達するのではないかと提言している[5]。フソバクテリウム・ヌクレアタムのうちおよそ80%がヒトの赤血球に接着し[37]、一時的な

菌血症が起きると口腔内のフソバクテリアが血液循環に入ることになる[5]。宿主の多糖類Gal-GalNAcは大腸癌に多く発現し、フソバクテリアの糖鎖結合蛋白(Gal-GalNAc-binding lectin(Fap2))を介してフソバクテリウム・ヌクレアタムの大腸癌への結合を媒介する[5]。加えてフソバクテリウム・ヌクレアタムの特徴的なFadA接着因子によってフソバクテリウム・ヌクレアタムは大腸粘膜細胞に接着し侵入する。FadA接着因子はE-カドヘリンに結合し、 β -カテニンシグナルを活性化し炎症性、腫瘍原性反応を特異的に調節することで細胞の増殖を促進する[1]。FadAの大腸癌での過剰発現は腫瘍原性、炎症性遺伝子の発現の増加と相関する[1]。興味深いことに腫瘍だけでなく大腸腺腫や癌の患者の正常粘膜でも健常者の正常大腸粘膜より10~100倍FadA量が高い[1]。

次の疑問はフソバクテリウム・ヌクレアタムがなぜステージIVの原発巣である大腸癌組織や周囲の正常粘膜組織に多いのかである。他の研究では大腸新生物を持つ同一の患者から得た便検体と対応した疾患（大腸癌や腺腫）または正常組織ではフソバクテリウム・ヌクレアタム量が異なるとの報告があり[2]、フソバクテリウム・ヌクレアタムが経管的に便から大腸粘膜へ移行するのは考えにくい。反対にフソバクテリウム・ヌクレアタムの感染は血液由来であるとの報告がある[5]。ゆえに我々はフソバクテリウム・ヌクレアタムが大腸癌の転移巣に存在し、血行性にステージIVの患者の大腸癌原発巣や周囲の正常組織への供給源となっているのではないかと推測した。しかしながら我々は適切なサンプルを得られなかったため大腸癌の転移巣のフソバクテリウム・ヌクレアタム量を評価できなかった。この推測を証明するためにはさらなる検証が必要である。

いくつかグループはフソバクテリウム・ヌクレアタム高値とhMLH1メチル化が相関したと報告している[3, 4, 33]。しかしながら我々の検討ではそのような相関関係は認めなかった。hMLH1メチル化のある大腸癌患者が少なかった(n=9)ためと考えられ、フソバクテリウム・ヌクレアタム高値とhMLH1メチル化の関係を調べるためにはさらなる検討が必要である。反対に今回の研究ではフソバクテリウム・ヌクレアタム高値とKRAS変が有意に相関した。しかしながらこれは過去の報告とは異なる結果であった[3, 4, 33]。この差異はそれぞれの研究とフソバクテリウム・ヌクレアタムを測定する方法が異なり、フソバクテリウム・ヌクレアタム高値群と低値群を決定するカットオフ値が異なるためと考えられる。

我々はフソバクテリウム・ヌクレアタムの測定にddPCRを用いており、正確なコピー数を測定することができ、quantitative real-time PCRより1000倍の感度があり[27]、我々の検討では大腸癌組織でフソバクテリウム・ヌクレアタムを検出できなかったのは25%

(25/100)のみであった。一方で他の研究では相対量を求めるのにreal-time PCRを使用しており、フソバクテリウム・ヌクレアタム陰性の頻度は研究によって差はあるが44~88%であった[3, 4, 33]。加えてフソバクテリウム・ヌクレアタム量と患者の予後の関連は意見が分かれている。Itoら[4]やCastellarinら[18]はフソバクテリウム・ヌクレアタム相対量をquantitative real-time PCRによって測定した場合、腫瘍組織中のフソバクテリウム・ヌクレアタム量と患者の予後に相関を認めなかったと報告している。過去の研究ではおそらくフソバクテリウム・ヌクレアタム偽陰性が含まれていると考えられ、フソバクテリウム・ヌクレアタムのコピー数と大腸癌の臨床病理学的、分子学的特徴の関連を調べるため

にはフソバクテリウム・ヌクレアタムを計測する標準化した方法が強く求められる。

7. 結語

フソバクテリウム・ヌクレアタムは大腸癌患者、特にステージⅣの患者において、その予後を予測するバイオマーカーとなり得る。我々の知見を支持するためには独立したデータを用いた検証研究が必要である。フソバクテリウム・ヌクレアタムを標的とした治療が大腸癌患者、特にステージⅣの患者の予後を改善するかどうかはさらなる検討が必要である。

8. 謝辞

本論文を作成するに当たりデータ解析のご支援をいただいた山口大学病院の岡山 直子様、水野 秀一様に心より感謝申し上げます。

この研究は科学研究費助成事業から助成をいただきました(No. 25460687)。

9. 参考文献

- [1] 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*. 2013; 14: 195–206.
- [2] 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*. 2014; 33: 1381–90.
- [3] Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, et al. *Fusobacterium* in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. *Cancer research*. 2014; 74: 1311–8.
- [4] Ito M, Kanno S, Nosho K, et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *Int J Cancer*. 2015; 137: 1258–68.
- [5] Abed J, Emgard JE, Zamir G, et al. Fap2 Mediates *Fusobacterium nucleatum* Colorectal Adenocarcinoma Enrichment by Binding to Tumor-Expressed Gal-GalNAc. *Cell Host Microbe*. 2016; 20: 215–25.
- [6] Li YY, Ge QX, Cao J, et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* infection with colorectal cancer in Chinese patients. *World J Gastroenterol*. 2016; 22: 3227–33.
- [7] Michaud DS. Role of bacterial infections in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 2013; 34: 2193–7.
- [8] Michaud DS, Izard J, Wilhelm-Benartzi CS, et al. Plasma antibodies to oral bacteria and risk of pancreatic cancer in a large European prospective cohort study. *Gut*. 2013; 62: 1764–70.
- [9] Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Curr Issues Mol Biol*. 2011; 13: 25–36.
- [10] Ohkusa T, Okayasu I, Ogiwara T, Morita K, Ogawa M, Sato N. Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2003; 52: 79–83.
- [11] Minami M, Ando T, Okamoto A, et al. Seroprevalence of *Fusobacterium varium* in ulcerative colitis patients in Japan. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009; 56: 67–72.
- [12] Strauss J, Kaplan GG, Beck PL, et al. Invasive potential of gut

- mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17: 1971–8.
- [13] Brook I, Frazier EH. Microbiological analysis of pancreatic abscess. *Clin Infect Dis.* 1996; 22: 384–5.
- [14] Shahani L, Khardori N. *Fusobacterium necrophorum*--beyond Lemierres syndrome. *BMJ Case Rep.* 2011; 2011.
- [15] Yoneda M, Kato S, Mawatari H, et al. Liver abscess caused by periodontal bacterial infection with *Fusobacterium necrophorum*. *Hepatol Res.* 2011; 41: 194–6.
- [16] Athavale NV, Leitch DG, Cowling P. Liver abscesses due to *Fusobacterium spp* that mimic malignant metastatic liver disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002; 21: 884–6.
- [17] Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012; 22: 292–8.
- [18] Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012; 22: 299–306.
- [19] 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.
- [20] Han YW, Ikegami A, Rajanna C, et al. Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria. *J Bacteriol.* 2005; 187: 5330–40.
- [21] Xu M, Yamada M, Li M, Liu H, Chen SG, Han YW. FadA from *Fusobacterium nucleatum* utilizes both secreted and nonsecreted forms for functional oligomerization for attachment and invasion of host cells. *J Biol Chem.* 2007; 282: 25000–9.
- [22] Ikegami A, Chung P, Han YW. Complementation of the fadA mutation in *Fusobacterium nucleatum* demonstrates that the surface-exposed adhesin promotes cellular invasion and placental colonization. *Infect Immun.* 2009; 77: 3075–9.
- [23] Human Microbiome Project C. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012; 486: 207–14.
- [24] Dewhirst FE, Chen T, Izard J, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010; 192: 5002–17.
- [25] Faust K, Sathirapongsasuti JF, Izard J, et al. Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS Comput Biol.*

2012; 8: e1002606.

[26] Ashare A, Stanford C, Hancock P, et al. Chronic liver disease impairs bacterial clearance in a human model of induced bacteremia. *Clin Transl Sci.* 2009; 2: 199–205.

[27] Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem.* 2011; 83: 8604–10.

[28] Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, eds. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th Edition: Wiley-Blackwell, 2009.

[29] Suehiro Y, Wong CW, Chirieac LR, et al. Epigenetic-genetic interactions in the APC/WNT, RAS/RAF, and P53 pathways in colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 2560–9.

[30] Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, et al. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:2560–9.

[31] 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. *Ann Clin Biochem.* 2017; 54: 86–91.

[32] 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(851–66): e24.

[33] Mima K, Nishihara R, Qian ZR, et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut.* 2016; 65: 1973–80.

[34] Stillwell AP, Ho YH, Veitch C. Systematic review of prognostic factors related to overall survival in patients with stage IV colorectal cancer and unresectable metastases. *World J Surg.* 2011; 35: 684–92.

[35] Mima K, Sukawa Y, Nishihara R, et al. *Fusobacterium nucleatum* and T Cells in Colorectal Carcinoma. *JAMA Oncol.* 2015; 1: 653–61.

[36] Galon J, Mlecnik B, Bindea G, et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol.* 2014; 232: 199–209.

[37] Tuttle RS, Strubel NA, Mourad J, Mangan DF. A non-lectin-like mechanism by which *Fusobacterium nucleatum* 10953 adheres to and

activates human lymphocytes. *Oral Microbiol Immunol*. 1992; 7: 78–83.

[38] Yuko Yamaoka, Yutaka Suehiro, Shinichi Hashimoto, et al.

Fusobacterium nucleatum as a prognostic marker of colorectal cancer in a Japanese population. *Journal of Gastroenterology*. 2018; 53(4): 517–524.