

Samspelet mellem mikrobiota og immunsystemet ved kolorektal cancer

Hans Raskov¹, Thomas Bjørnsholt², Mahdi Alamili³, Kasper Nørskov Kragh² & Ismail Gögenur⁴

STATUSARTIKEL

1) Center for Surgical Science, Sjællands Universitetshospital, Køge

2) Costerton Biofilm Center, Københavns Universitet

3) Gastroenheden, Hvidovre Hospital

4) Kirurgisk Afdeling, Sjællands Universitetshospital, Køge

Ugeskr Læger
2018;180:V04180253

Lokalisation, TNM-klassifikation, histologi og molekylærbiologi er afgørende for valg af behandling ved kolorektal cancer. Betydningen af immunsystemet og tarmens mikrobiota er i fokus, da studier viser, at begge spiller betydende roller for karcinogenesen, behandlingsforløbet og de langtidsonkologiske resultater.

Interaktion mellem immunsystemet og mikrobiota kan blive en vigtig faktor i fremtidig behandling af kolorektal cancer, som formentlig kommer til at omfatte både immun- og mikrobiotamodulerende midler.

Individuelle immunologiske og mikrobiologiske profiler kan få betydning for definition af risikogrupper, behandling og followupprogrammer. I artiklen gennemgås ny viden, der tyder på, at immunstatus og mikrobiotaprofil sandsynligvis også får stor betydning for prognose og targeteret behandling af kolorektal cancer.

MIKROBIOTA OG KOLOREKTAL KARCINOGENESE

Sammensætningen af tarmens mikroorganismer (mikrobiota) spiller ikke alene en afgørende rolle for vores fysiske (og formentlig også mentale) sundhed, men ligeledes for dysplasi og karcinogenese. Bakteriesammensætning og immunsystem indgår i dag i den samlede forståelse af karcinogenesen ved kolorektal cancer. Det er velkendt, at kroniske infektioner kan medføre cancer, da egenskaber, som mikroorganismer anvender til koordinering af invasion og vedligeholdelse af infektion, kan afspore cellulære replikationsprocesser. For nuværende anses det ikke for sandsynligt, at enkelte bakteriestammer er i stand til at frembringe afgørende mutationer i karcinogenesen, men snarere, at et dysbiotisk mikrobiota baner vej for dysplasi og cancer [1, 2].

Det normale mikrobiota får med stigende alder en tiltagende proinflammatorisk profil og lavere biodiversitet (dysbiose), bl.a. fordi andelen af bakterier, der tilhører den fylogenetiske hovedgruppe Firmicutes (herunder Clostridiales, Streptococcaceae og Lactobacillales) reduceres. Med alderen ses der også ofte et fald i antallet af immunkompetente T-celler [3].

I det dysbiotiske mikrobiota falder produktionen af epitelcellernes vigtigste energikilde – de kortkædede fedtsyrer – hvilket bl.a. medfører stigende intraluminale pH-værdier og reduceret suppression af proinflammatoriske cytokiner, bl.a. interleukiner og tumornekrosefaktor alfa. Med akkumulerede, sporadiske eller nedarvede mutationer og epigenetiske ændringer udvikles der et kritisk miljø, som er afgørende for udvikling af kolorektal cancer (Figur 1) [4, 5].

Ved kolorektal cancer kan der hos flere end 80% påvises dysbiose med reduceret diversitet, ofte med øget forekomst af mulige *driver*-bakterier som enterotoksisk *Bacteroides fragilis* og *Fusobacterium nucleatum*, der residerer i polymikrobielle og prokarcinogene biofilm. Af andre mulige *driver*-bakterier kan nævnes colibaktinproducerende *Escherichia coli*, *Streptococcus gallolyticus*, *Porphyromonas gingivalis* og *Eubacterium rectale*. Flere vil helt sikkert komme til [5-7]. F.eks. er infiltration af *F. nucleatum* i en tumor forbundet med genominstabilitet, dvs. mikrosatellitinstabilitet (MSI), øget antal mutationer pga. epigenetisk nedregulering eller mutationer i *mismatchrepair*-gener, større risiko for lymfeknudemetastaser og recidiv, kompromitteret T-celle- og NK-cellefunktion, kemoterapieresistens samt forringet overlevelse [8, 9].

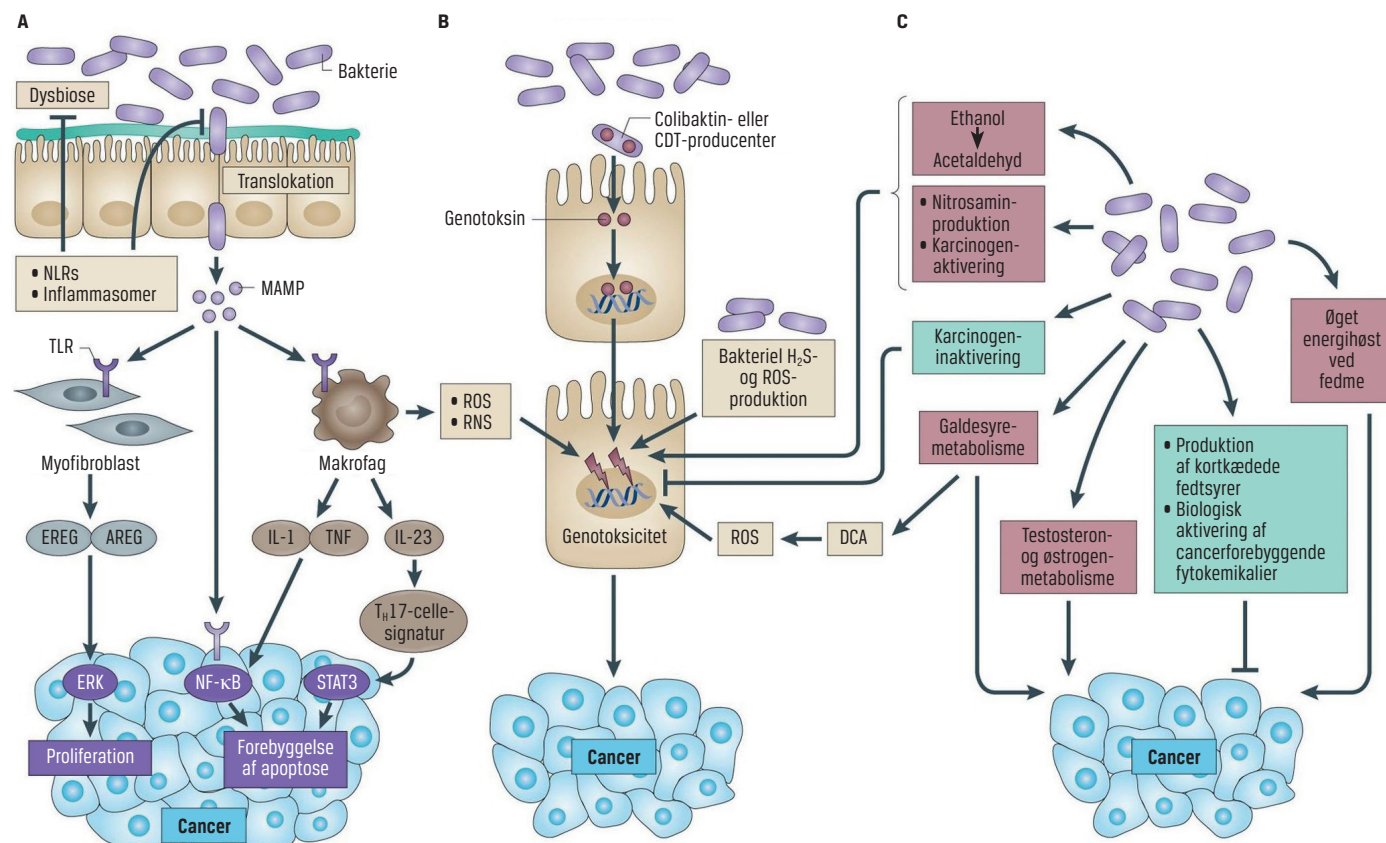
Andelen af tumorer, der er koloniseret med *F. nucleatum* øges i oral retning fra rectum mod caecum og

HOVEDBUDSKABER

- ▶ Samspelet mellem mikrobiota og immunsystemet ved kolorektal cancer spiller tilsyneladende en langt større rolle, end vi hidtil har forestillet os.
- ▶ Langtidsresultaterne af kolorektal cancerbehandling afhænger efter alt at dømme af interaktionen mellem mikrobiota og immunsystemet.
- ▶ Individuel kortlægning af mikrobiota- og immunsystemprofiler kan få stor betydning for targeteret behandling og bidrage til bedre stratificering af risikogrupper og bedre followupprogrammer til patienter med kolorektal cancer. I planlagte studier vil man fokusere på mikrobiota og immunsystemet som et muligt interventionsområde for både prævention og behandling.

 FIGUR 1

Mikrobiota medvirker til karcinogenese via forskellige mekanismer. **A.** Dysbiose, kompromitteret mucosabarriere og inflammation via MAMP og aktivering af TLR. **B.** Toksisk effekt af bakterielle toksiner som colibactin og CDT, reaktive iltforbindelser og bakterielt H₂S. **C.** Bakteriernes metabolisme genererer toksiner som f.eks. acetaldehyd og nitrosaminer. Mikrobiota kan også mediere tumorsuppressiv effekt (grønne bokse) ved inaktivering af karcinogener og ved produktion af kortkædede fedtsyrer som butyrat og propionat. Redigeret udgave af billede med tilladelse fra Springer Nature [4].



AREG = amphiregulin; CDT = *cytolethal distending toxin*; DCA = doxicholsyde; EREG = epiregulin; ERK = *extracellular signal-regulated kinase*; IL = interleukin; MAMP = *microorganism-associated patterns*; NF = nuklearfaktor; NLR = *nucleotide-binding and oligomerisation domain-like receptor*; RNS = *reactive nitrogen species*; ROS = *reactive oxygen species*; STAT = *signal transducer and activator of transcription*; T_H17 = T-hjælpercelle; TLR = *toll-like receptors*; TNF = tumornekrosefaktor.

kan isoleres fra stort set alle tumorer oralt for højre colonfleksur. Bakteriestammer med identisk genetisk profil har kunnet isoleres fra en primærtumor og levermetastaser, hvilket tyder på, at bakterierne er i stand til at rejse med migrerende tumorceller og blodlegemer (evt. intracellulært) til fjerne organer og fortsat præge tumorcellerne dér [10, 11].

TARMENS BIOFILM

Biofilm kan ikke alene forstærke eller accelerere dysplasi og malign transformation, men også påvirke tumorer og immunsystemet og dermed have betydning for progression og prognose. Disse forhold er formentlig også medvirkende til forskelle i kliniske forløb og onkologiske resultater mellem højre- og venstresidig coloncancer, idet der i langt højere grad findes udbredte biofilm og forekomst af potentielle *driver*-bakte-

rier ved højresidig end ved venstresidig coloncancer [12, 13].

Ved forekomst af karcinogen biofilm forstås massiv bakteriel invasion i den dybe del af mucuslaget. Det normale mucuslag i colon er tolaget, hvoraf det inderste, som fylder krypter og dækker epitelceller, under normale omstændigheder er sterilt og forhindrer direkte kontakt mellem mikroorganismer og epitelceller, især stamcellenicher i colonkrypterne [14, 15]. Forekomst af biofilm i dette mucuslag og i direkte kontakt med epitelceller betragtes derfor som patologisk [16]. Biofilm er aggregerede bakterielle strukturer, som huser millioner eller milliarder bakterier. Bakterierne klistres sammen ved hjælp af ekstracellulær matrix og adhærer til hinanden og til overflader ved hjælp af pili og fimbriae. Den ekstracellulære matrix udgør en stor del af biofilmmassen og produceres

især af dominerende tarmbakterier som Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria og Actinobacteria. Matrixstrukturen er robust og sørger for, at bakterierne pakkes tæt og i intim kontakt med epitelcellerne. I biofilmen øges bakteriernes chancer for at overleve og antibiotikatoleransen kan være øget med op til 1.000 gange i forhold til toleransen hos bakterier, som befinder sig uden for biofilmen [17, 18].

I adenomvæv, cancervæv og normalt colonepitel tæt ved tumoren kan der ofte påvises biofilm i tæt relation til underliggende epitelceller (Figur 2), i hvilke der bl.a. kan påvises reduceret niveau af E-cadheriner, øget forekomst af interleukin-6, øget intestinal permeabilitet og *signal transducer and activator of transcription* 3-aktivering [17].

Fra screeningskoloskopier ved vi, at der hos 13-15% af raske personer kan påvises spredte, tynde biofilm, som har langt mindre udstrækning end de tykke, mere kompakte biofilm, som ofte ses hos patienter med inflammatorisk tarmsygdom og patienter med kolorektal cancer (Figur 2).

Hos patienter med familiær adenomatøs polypose er der betydelig øget risiko for udvikling af kolorektal cancer. Et nyligt publiceret studie viste, at biofilm, der er domineret af enterotoksisk *B. fragilis* og colibaktinproducerende *E. coli* formentlig spiller en central rolle i karcinogenesen [19]. Begge er tidligere påvist at have karcinogent potentiale.

HØJRESIDIG VS. VENSTRESIDIG COLONCANCER

Man har længe været opmærksom på en signifikant forskel i behandlingsresultater ved højre- og venstresidig

coloncancer. Således har højresidig coloncancer dårligere prognose end venstresidig både mht. progressionsfri overlevelse og samlet overlevelse, uanset demografi og stadium [20]. Man ved ikke meget om årsagen til denne forskel i det kliniske forløb, men forekomsten af markante biofilm i højre side af colon ved højresidig coloncancer og mulig interaktion mellem mikroorganismer, cancerceller og immunsystem kan være en afgørende faktor. Da højre og venstre side af colon endvidere er fysiologisk og embyologisk forskellige, bør de respektive cancer muligtvis betragtes som forskellige lidelser [20].

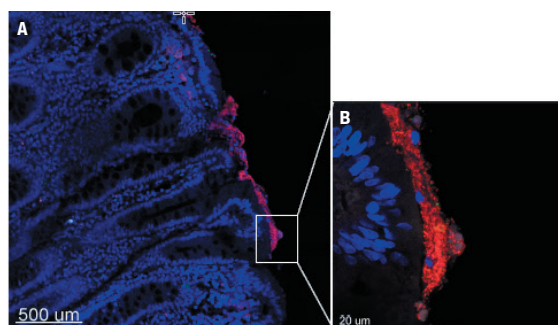
Forekomst af substantielle biofilm i højre side af colon (oralt for højre fleksur) er set hos stort set alle (89%) patienter med adenomer og coloncancer, mens venstresidige adenomer og coloncancer sjældent var positive (12%). Undersøgelse af resektionsrande i god afstand fra en tumor viste 100% konkordans med biofilmpositivitet/-negativitet. Det vurderes, at biofilm kan være en vigtig faktor for karcinogenese ved højresidig coloncancer [21], og nye generationer af antibiotika, der omfatter biofilminhibitorer og *quorum sensing* (bakteriers evne til at kommunikere med hinanden)-inhibitorer kan blive en vigtig del af fremtidig behandling af kolorektal cancer.

Kliniske studier af metastaserende coloncancer behandlet med konventionel kemoterapi i kombination med bevacizumab eller cetuximab viste, at patienter med højresidig coloncancer, uanset *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*-status, havde signifikant kortere progressionsfri overlevelse og kortere samlet overlevelse (19 vs. 33 måneder) end patienter med venstresidig coloncancer [22, 23].

FIGUR 2

A. Normalt colonepitel i resektatet fra en patient med højresidig coloncancer. Der ses en op til 15 µm tyk biofilm adhærent til epiteloverfladen. Biofilmen er farvet rød med specifikke PNA-FISH-prober, der hybridiseres til bakterielt 16s rRNA. Eukaryote celler er farvet blå med det uspecifikke nukleotidfarvestof DAPI. (200 × forstørrelse. Eget billedmateriale. Farvning og mikroskopi udført på Costerton Biofilm Center, Københavns Universitet).

B. Nærbillede af bakteriel biofilm på colonepitel. Individuelle stavformede bakterier i biofilmen ses tydeligt. Blå eukaryote celler ses at omgive biofilmen. (630 × forstørrelse).



IMMUNOLOGI, PROGNOSE OG BEHANDLING

Et normalt fungerende mikrobiota med høj diversitet optimerer immunkompetente cellers funktion og har især betydning for effekten af immunterapi med checkpointinhibitorer [24] og flere konventionelle kemoterapeutika som f.eks. oxaliplatin, 5-fluorouracil og capecitabin [25]. Signifikant klinisk respons og forlænget progressionsfri overlevelse sås hos patienter, der var i programmeret celledød 1 (PD1)-terapi, når der var høj biodiversitet, højt niveau af *Faecalibacterium* og *Ruminococcaceae* (begge tilhørende Clostridiales) og et øget antal CD4+ og DC8+ i det systemiske kredsløb. Modsat havde nonrespondere lav biodiversitet med høj forekomst af *Bacteroides* og *E. coli*. Overordnet havde antibiotikabehandling en negativ indvirkning på den terapeutiske effekt af PD1-inhibition [26].

I 2006 kom den første større opgørelse med fokus på en mulig association mellem immunsystemet og overlevelsen efter operation for kolorektal cancer [27]. Ved at karakterisere T-celleinfiltrationen i en tumor kunne man for første gang vise, at prognosen var mere

afhængig af, hvor mange T-celler der var i tumoren, end af størrelsen på primærtumoren, eller om der var lymfeknudemetastaser. Resultaterne er eftervist flere gange, hvilket konfirmerer, at hvis en tumor er detekteret af immunsystemet, er overlevelsen bedre selv med lymfeknudemetastaser, end hvis en tumor er lille og uden lymfeknudemetastaser, men ikke detekteret af immunsystemet. Samme forhold gør sig gældende ved metastatisk sygdom: hvis immunsystemet har »opdaget« metastasen i leveren, er prognosen langt bedre, end hvis det ikke har [28].

Membranreceptorerne PD1-protein og *cytotoxic T lymphocyte-associated 4* (CTLA-4) er inhibitoriske receptorer eller immunologiske checkpointproteiner, som udtrykkes af T-celler, B-celler, monocytter og *natural killer*-celler. Liganderne til PD1 og CTLA4 (PD-L1/PD-L2 og CD80/CD86) opreguleres i forbindelse med det inflammatoriske respons, hvorunder receptor-ligand-komplekset nedtoner T-celleresponsen og reducerer risikoen for *collateral damage* på eget væv og udvikling af autoimmunitet. Dette immunhæmmende system udnytter cancercellerne ved at udtrykke samme ligander og hæmme det cytotoxiske immunrespons. I tumorens mikromiljø vil persisterende ligandbinding til T-cellernes checkpointproteiner føre til udtrætning af T-cellefunktionen og ringere behandlingseffekt/behandlingssvigt.

Monoklonale antistoffer eller checkpointinhibitorer, der er rettet mod checkpointproteiner, forhindrer receptor-ligand-kompleksdannelsen og booster dermed det T-cellemedierede immunrespons mod neoplastiske celler. Behandling med checkpointinhibitorer øger overlevelsen ved adskillige cancerformer og også ved coloncancer af typen *MSI-high*.

Ved coloncancer er det især tumorer af typen *MSI-high* med T-celleinfiltration, der responderer godt på checkpointinhibitorer. Checkmate 142-studiet med checkpointinhibitorer til avanceret *MSI-high*-coloncancer viste signifikant øget responsrate og progressionsfri overlevelse, hvorfor behandlingen nu tilføjes guidelines.

Kliniske undersøgelser af checkpointinhibitorer i kombination med anden immunterapi som f.eks. *anti-epidermal growth factor* og *anti-vascular endothelial growth factor* eller med konventionel cytotoxisk kemoterapi er i gang eller godkendte, ligesom andre undergrupper af coloncancer, f.eks. signetringcelle-adenokarcinom/lavtdifferentieret adenokarcinom p.t. inkluderes i kliniske studier [29, 30].

KONKLUSION

Interaktion mellem mikrobiota og immunsystemet er af betydning for udvikling af kolorektal cancer, sygdomsprogression og effekten af onkologisk behandling. Fremtidig behandling af kolorektal cancer kommer

muligvis til at omfatte mikrobiota- og immunmodulerende midler, biofilminhibitorer og *quorum sensing*-inhibitorer.

Ved eubiosis udviser mikrobiota antitumoreffekt ved at optimere de immunkompetente cellers funktion og dermed effekten af immunterapi med checkpointinhibitorer og cytotoxisk kemoterapi med f.eks. oxaliplatin, 5-fluorouracil og capecitabin. Det er afgørende at udføre kliniske studier med inklusion af translationel metodologi og derved udvikle en stratificeret og med stor sandsynlighed multimodal, targeteret behandling af kolorektal cancer

SUMMARY

Hans Raskov, Thomas Bjarnsholt, Mahdi Alamili, Kasper Nørskov Kragh & Ismail Gögenur:

Interaction between microbiota and immune system in colorectal cancer

Ugeskr Læger 2018;180:V04180253

In vivo- and in vitro research accumulate mounting evidence, that the interaction between the colorectal microbiota and the immune system plays an important role in the development and progression of colorectal cancer and for the treatment outcomes. In future, modulation of the microbiota and immune system will, by all accounts, become important targets for prevention and treatment of colorectal cancer. In this review, we summarise current knowledge on bacterial drivers, biofilm formation, colon cancer sidedness and oncological treatment of colorectal cancer including the use of checkpoint inhibitors.

KORRESPONDANCE: Hans Raskov. E-mail: raskov@mail.dk

ANTAGET: 19. september 2018

PUBLICERET PÅ UGESKRIFTET.DK: 5. november 2018

INTERESSEKONFLIKTER: ingen. Forfatterens ICMJE-formularer er tilgængelige sammen med artiklen på Ugeskriftet.dk

En fuldstændig litteraturliste kan fås ved henvendelse til forfatterne.

LITTERATUR

- Sun J, Kato I. Gut microbiota, inflammation and colorectal cancer. *Genes Dis* 2016;3:130-43.
- Raskov H, Burcharth J, Pommergaard H-C. Linking gut microbiota to colorectal cancer. *J Cancer* 2017;8:3378-95.
- van der Geest KSM, Kroesen BJ, Horst G et al. Impact of aging on the frequency, phenotype, and function of CD161-expressing T cells. *Front Immunol* 2018;9:752.
- Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer* 2013;13:800-12.
- Drewes JL, White JR, Dejea CM et al. High-resolution bacterial 16S rRNA gene profile meta-analysis and biofilm status reveal common colorectal cancer consortia. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2017;3:34.
- Purcell RV, Pearson J, Aitchison A et al. Colonization with enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* is associated with early-stage colorectal neoplasia. *PLoS One* 2017;12:e0171602.
- Kumar R, Herold JL, Taylor J et al. Variations among *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* strains in connection with colorectal cancer. *Sci Rep* 2018;8:1514.
- Nosho K, Sukawa Y, Adachi Y et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016;22:557-66.
- Yu T, Guo F, Yu Y et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy. *Cell* 2017;170:548-63.
- Bullman S, Pedamallu CS, Sicinska E et al. Analysis of *Fusobacterium* persistence and antibiotic response in colorectal cancer. *Science* 2017;358:1443-8.

11. Mima K, Cao Y, Chan AT et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue according to tumor location. *Clin Transl Gastroenterol* 2016;7:e200.
12. Lee B, Mendis S, Lee M et al. Left versus right sided colorectal cancer: teasing out drivers of disparity in outcomes in metastatic disease. *J Clin Oncol* 2017;35:682.
13. Jung M-K, Shin US, Ki Y-J et al. Is the location of the tumor another prognostic factor for patients with colon cancer? *Ann Coloproctol* 2017;33:210-8.
14. Johansson MEV, Hansson GC. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat Rev Immunol* 2016;16:639-49.
15. Hansson GC, Johansson ME. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes* 2010;1:51-4.
16. Dejea CM, Sears CL. Do biofilms confer a pro-carcinogenic state? *Gut Microbes* 2016;7:54-7.
17. Li S, Konstantinov SR, Smits R et al. Bacterial biofilms in colorectal cancer initiation and progression. *Trends Mol Med* 2017;23:18-30.
18. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:563-75.
19. Dejea CM, Fathi P, Craig JM et al. Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science* 2018;359:592-7.
20. Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K et al. Prognostic survival associated with left-sided vs right-sided colon cancer: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol* 2017;3:211-9.
21. Drewes JL, Housseau F, Sears CL. Sporadic colorectal cancer: microbial contributors to disease prevention, development and therapy. *Br J Cancer* 2016;115:273-80.
22. Karakas Y, Dizdar O. Tumor sidedness and prognosis in colorectal cancer: is microbiome the missing link? *JAMA Oncol* 2017;3:1000.
23. Tejpar S, Stintzing S, Ciardiello F et al. Prognostic and predictive relevance of primary tumor location in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer: retrospective analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 trials. *JAMA Oncol* 2017;3:194-201.
24. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* 2018;359:91-7.
25. Aarnoutse R, de Vos-Geelen JMPGM, Penders J et al. Study protocol on the role of intestinal microbiota in colorectal cancer treatment: a pathway to personalized medicine 2.0. *Int J Colorectal Dis* 2017;32:1077-84.
26. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* 2018;359:97-103.
27. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960-4.
28. Mlecnik B, van den Eynde M, Bindea G et al. Comprehensive intrametastatic immune quantification and major impact of immunoscore on survival. *J Natl Cancer Inst* 2018;110(1).
29. Karachaliou N, Gonzalez-Cao M, Sosa A et al. The combination of checkpoint immunotherapy and targeted therapy in cancer. *Ann Transl Med* 2017;5:388.
30. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R et al. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. *Front Pharmacol* 2017;8:561.