

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08444

研究課題名(和文) 膵癌における腸内細菌叢を介した腫瘍免疫機構の解明

研究課題名(英文) Tumor microenvironment and gut microbiota in pancreatic cancer

研究代表者

増田 充弘 (Masuda, Atsuhiko)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：60512530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、膵癌局所に細菌感染が認められることが明らかとなり、膵発癌やその進展に重要な役割を果たしている事が示唆されている。しかし、どのような菌種がどのように膵発癌と進展に関与するかについては不明な点が多い。本研究ではヒト膵癌の病理組織を用いて癌の微生物叢プロファイルと病理像・臨床像との関連を調査した。正常膵組織と比較して膵癌では16SrDNAの高い増幅反応を認め、次世代シーケンサーによる解析では既報と同様の菌を同定し得た。さらにLPSの免疫染色を行いLPS陽性膵癌は予後不良である事、腫瘍免疫が抑制されている事を見出した。現在、in situ hybridizationを追加し検討を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、膵癌組織中の細菌叢解析を行う事で膵癌の予後や腫瘍内免疫に当たる影響を調査するものである。予後の悪い膵癌の発癌及び進展機構を解明することで、予後改善に向けた病態解明につながる可能性があると考えられる。事実、細菌の構成成分の一つであるLPS陽性膵癌では予後不良であり、腫瘍免疫が抑制されている事を見出した。今後はさらに詳細に解析を追加し結果の信頼性を高めるとともにプロバイオティクスによる細菌制御法について研究を進め、膵癌の予後改善を目指す。

研究成果の概要(英文)：In recent years, it has become clear that bacterial infection is locally observed in pancreatic cancer, suggesting that it plays an important role in pancreatic carcinogenesis and its progression. However, there are still unclear what and how bacterial species are involved in pancreatic carcinogenesis and progression. In this study, we investigated the relationship between the microbiota profile of cancer and the pathological and clinical features using the histopathology of human pancreatic cancer. Compared with normal pancreatic tissue, pancreatic cancer showed a high amplification reaction of 16S rDNA, and analysis by the next-generation sequencer could identify the same bacteria as previously reported. Furthermore, immunostaining of LPS revealed that LPS-positive pancreatic cancer had a poor prognosis and that tumor immunity was suppressed. Currently, we are considering adding in situ hybridization.

研究分野：消化器内科

キーワード：膵癌 細菌叢 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト膵癌組織を用いた解析により、膵癌局所に細菌・真菌感染が認められることが明らかとなり、微生物感染が膵発癌やその進展に重要な役割を果たしていることが示唆されている。しかし、どのような菌種が膵発癌に主に関わり、また微生物感染がどのように膵発癌とその進展に関わるのかについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究ではヒト膵癌の病理組織を用いて組織に感染している微生物叢プロファイルと病理像・臨床像との関連を調べることで、ヒト膵発癌とその進展における微生物感染の意義を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

、当院にて2007年10月～2017年5月までに切除されたヒト膵癌162症例のパラフィン包埋切片(FFPE)を用いて、以下の解析を行う。

膵癌組織内に存在する細菌の構成と多様性の解明

神戸大学医学部附属病院における膵癌手術症例のパラフィン包埋切片(FFPE)を収集し、腫瘍部のDNA抽出を行う。ヒト膵癌組織内に細菌が存在していることを証明するため、16SrRNAを対象としてreal-time PCR法を用いる。16SrRNAが検出された症例に対し、次世代シーケンサー(Miseq)を用いたメタ16S解析法により組織中の細菌叢の多様性および菌叢構成比率を解析する。細菌のOUT分類を用いてdatabaseを参照し、系統分類学的同定を行う。多様性の解析には、および多様性の比較や主座標分析を用いる。また、腫瘍内細菌の証明方法として、グラム陰性桿菌外膜の成分であるLPS(リポ多糖)を標的とした免疫組織化学染色、16SrRNAを標的としたin situ-hybridizationを行う。

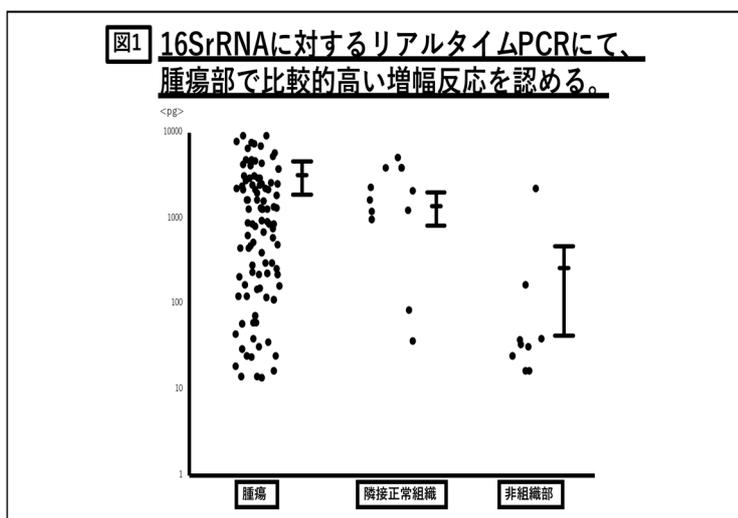
膵癌内細菌が腫瘍周囲微小環境へ与える影響、予後との関連性の解明

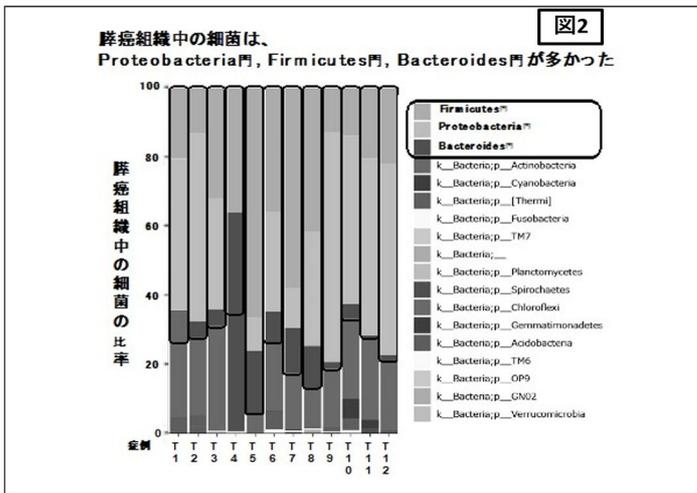
FFPE切片を用いて、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、FOXP3陽性T細胞の密度を画像解析ソフトであるImage Jを用いて単位面積あたりの細胞数を算出する。また、エラスチカワーギンソン染色(EVG染色)により腫瘍組織内の膠原線維を染色し、さらに癌関連線維芽細胞(CAF)のマーカーであるSMAに対する免疫組織化学染色を行いそれぞれ画像解析ソフトであるPhotoshopを用いて染色面積を算出し、腫瘍組織内の線維化の程度を評価する。これらの免疫・線維化の情報、さらに予後(全生存期間・疾患特異的生存期間)と、上記で解析した腫瘍内細菌との関連性を評価する。

4. 研究成果

膵癌腫瘍内細菌の証明と菌叢解析

膵癌手術症例のパラフィン包埋切片(FFPE)から抽出した腫瘍のDNAを使用し、16SrDNAに対するreal-time PCRを行った。コントロールとして腫瘍の隣接正常組織、さらにパラフィンの非組織部からも同様の方法で抽出したDNAを使用した。その結果、**腫瘍部からは107サンプルで16SrDNAの増幅反応を認めた。**腫瘍だけでなく正常組織からも増幅反応を認めたが、腫瘍部で比較的高い反応を認めた(図1)。また、一部の膵癌サンプルを使用して次世代シーケンサーを用いた菌叢解析を行ったところ、既報と同様に、**プロテオバクテリア門、ファーミキューテス門、バクテロイデス門**を中心とした細菌群を同定し得た

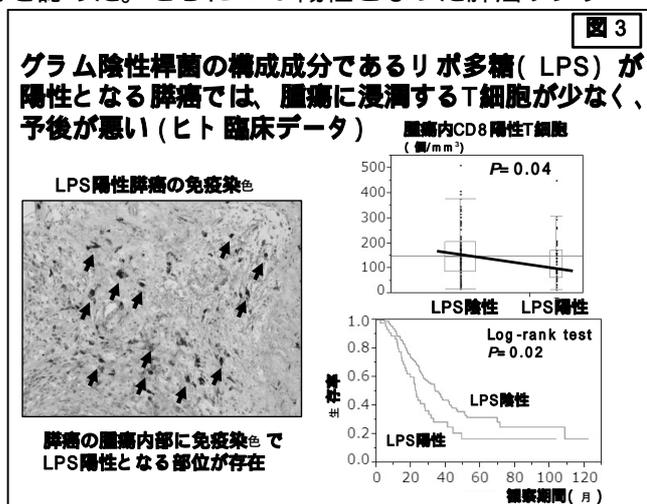




(図2)。サンプル数が少ないため有意差検定は行っていないものの、腫瘍部・正常組織・非組織部のそれぞれを比較した多様性解析ではそれぞれの菌叢構成に差異を認める傾向にあった。これらの結果は膀胱腫瘍内細菌が存在することを証明する結果と考えられたが、qPCRの結果は非組織部とほぼ変わらない値で検出されることも多く、コンタミネーションを捉えている可能性も示唆された。そのため、後述するさらなる手法を用いて腫瘍内細菌の存在の証明を試みた。

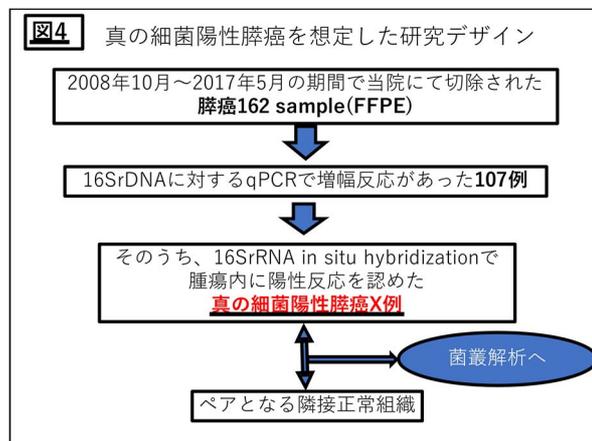
膀胱組織内のLPSの検出と予後・免疫細胞、部位との関連

ヒト膀胱癌 FFPE 検体を使用したりボ多糖(LPS)に対する免疫組織化学染色では、162 サンプル中 36 サンプル(22.2%)で腫瘍内に陽性反応を認めた。さらに LPS 陽性となった膀胱癌サンプルと LPS 陰性であった膀胱癌サンプルを用いて予後・免疫状態の比較を行ったところ、LPS 陽性となる膀胱癌では腫瘍に浸潤する T 細胞が少なく、かつ予後が悪化しているという結果を見出した(図3)。さらに LPS 陽性膀胱癌は、膀胱頭部に有意に多く存在していることが判明した。これらの結果から、十二指腸から侵入した細菌が腫瘍に浸潤した結果、腫瘍免疫を抑制し、予後の悪化につながる可能性が示された。しかし、LPS はあくまで細菌の存在を示唆する間接的な所見に過ぎず、この結果のみで膀胱癌に細菌が存在することを論ずることは難しいと考えた。そのため、後述の in situ hybridization も併用してさらなる調査を進めた。



in situ hybridization を使用した真の細菌陽性膀胱癌の同定と、腫瘍微小環境と細菌の関連性の証明

膀胱癌 FFPE 切片を用いて 16SrRNA に対する in situ hybridization(ish)を実施したところ、26/55 サンプルで腫瘍内に陽性反応を認めた。この結果は、LPS の結果とは相関しなかった。我々は、qPCR と ish の結果がそれぞれ腫瘍内細菌本体の存在を示唆する信頼性の高い情報であると想定し、両者の結果が陽性であったサンプルを「真の細菌陽性膀胱癌」と考えた。現在想定している研究デザインを図4に示す。現時点で qPCR 陽性 + ish 陽性である 26 サンプル(細菌陽性膀胱癌)と qPCR 陰性である 55 サンプル(細菌陰性膀胱癌)を比較する解析を行ったところ、EVG 染色による染色面積が多いもの(線維化の強いもの)が、細菌陽性膀胱癌で有意に多く(69.2% vs 38.1%; p=0.0090)、CD8 陽性細胞が細菌陽性膀胱癌で有意に少ない(26.9% vs 50.9%; p=0.0041)という結果を見出している。全てのサンプルで ish 実施後に、菌叢解析を含めたさらなる検討を計画している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 3件）

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 Sakai Arata, Masuda Atsuhiko, Eguchi Takaaki, Anami Takahiro, Nishi Katsuhisa, Furumatsu Keisuke, Okabe Yoshihiro, Kakuyama Saori, Sato Yu, Nishioka Chiharu, Sanuki Tsuyoshi, Yagi Yosuke, Kobayashi Takashi, Shiomi Hideyuki, Kodama Yuza | 4. 巻 56 |
| 2. 論文標題 Clinical outcome of conservatively managed pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms with mural nodules and main duct dilation | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology | 6. 最初と最後の頁 285 ~ 292 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01739-y | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Tanaka Takeshi, Masuda Atsuhiko et al. | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Acute pancreatitis in intraductal papillary mucinous neoplasms correlates with pancreatic volume and epithelial subtypes | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Pancreatology | 6. 最初と最後の頁 138 ~ 143 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2020.11.005 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yamakawa K, Masuda A, Nakagawa T, Shiomi H, Toyama H, Takenaka M, Sakai A, Kobayashi T, Tsujimae M, Ashina S, Yamada Y, Tanaka T, Tanaka S, Nakano R, Sato Y, Ikegawa T, Kurosawa M, Fujigaki S, Kutsumi H, Itoh T, Fukumoto T, Kodama Y. | 4. 巻 19(3) |
| 2. 論文標題 Additional value of preoperative pancreatic juice cytology on imaging study in patients with intraductal papillary mucinous neoplasm; a retrospective cohort study | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Pancreatology | 6. 最初と最後の頁 424-428 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2019.02.013. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Sakai A, Tsujimae M, Masuda A, Iemoto T, Ashina S, Yamakawa K, Tanaka T, Tanaka S, Yamada Y, Nakano R, Sato Y, Kurosawa M, Ikegawa T, Fujigaki S, Kobayashi T, Shiomi H, Arisaka Y, Itoh T, Kodama Y. | 4. 巻 21;25(11) |
| 2. 論文標題 Clinical outcomes of ampullary neoplasms in resected margin positive or uncertain cases after endoscopic papillectomy. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 World J Gastroenterol. | 6. 最初と最後の頁 1387-1397 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v25.i11.1387. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 Tsujimae M, Masuda A, Shiomi H, Toyama H, Sofue K, Ueshima E, Yamakawa K, Ashina S, Yamada Y, Tanaka T, Tanaka S, Nakano R, Sato Y, Ikegawa T, Kurosawa M, Fujigaki S, Kobayashi T, Sakai A, Kutsumi H, Zen Y, Itoh T, Fukumoto T, Kodama Y. | 4. 巻 34(9) |
| 2. 論文標題 Significance of pancreatic calcification on preoperative computed tomography of intraductal papillary mucinous neoplasms. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol. | 6. 最初と最後の頁 1648-1655 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14732. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| 1. 著者名 Shiomi H, Kobayashi T, Sakai A, Shiomi Y, Masuda A, Bondoc EM, Kodama Y. | 4. 巻 51(10) |
| 2. 論文標題 Endoscopic ultrasound-guided gastrojejunostomy using fully covered metal stent combined with large-loop double-pigtail stent for malignant afferent loop syndrome. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Endoscopy. | 6. 最初と最後の頁 E303-E304. |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-0916-8532. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1. 著者名 Ezaki T, Masuda A, Shiomi H, Nakagawa T, Sofue K, Toyama H, Zen Y, Kodama Y. | 4. 巻 14;13(2) |
| 2. 論文標題 Type 1 Autoimmune Pancreatitis with Imaging Appearance Similar to That of Malignant Cystic Tumor. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Case Rep Gastroenterol. | 6. 最初と最後の頁 265-270. |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000500477. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1. 著者名 Inomata N, Masuda A, Itani T, Hayashi M, Shimada Y, Adachi K, Hashimoto K, Tanaka Y, Tanaka A, Kobayashi T, Sakai A, Shiomi H, Kodama Y. | 4. 巻 なし |
| 2. 論文標題 An autopsy case of granulocyte colony-stimulating factor-producing pancreatic adenosquamous carcinoma. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Clin J Gastroenterol. | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-019-01067-6 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|-----------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 山川康平、増田充弘、児玉裕三 |
| 2. 発表標題 膵管内乳頭粘液産生腫瘍に対するERCP下膵液細胞診の役割 腫瘍の病理学的特徴との対比を含めて |
| 3. 学会等名 日本消化器内視鏡学会総会 シンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 中野遼太、増田充弘、藤垣誠治、小林隆、酒井新、塩見英之、児玉裕三 |
| 2. 発表標題 IPMN術後の残膵再発に関与する因子の検討 糖尿病の新規発症及び増悪の関連性 |
| 3. 学会等名 日本膵臓学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|----------------------------------------------|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 井上 潤 (Inoue Jun) (50631561) | 神戸大学・医学部附属病院・助教 (14501) | |
| 研究分担者 | 児玉 裕三 (Kodama Yuzo) (80378687) | 神戸大学・医学研究科・教授 (14501) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|