

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17479

研究課題名(和文)超音波内視鏡下針生検による膵臓癌腫瘍内細菌叢の検出可能性の研究

研究課題名(英文) Analysis of the pancreatic cancer microbiome using endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration derived samples

研究代表者

川本 泰之 (Yasuyuki, Kawamoto)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：60755601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：2019年5月から2020年3月の間に30症例から膵臓腫瘍検体を収集した。腫瘍内細菌の由来を検討するため、超音波内視鏡下針生検(EUS-FNA)検体採取時に、胃粘膜・十二指腸粘膜も同時に収集し、合計90検体が収集された。検体解析成功率は、膵臓EUS-FNA：80%、胃粘膜：100%、十二指腸粘膜：97%であった。膵臓FNA検体における多様性は胃・十二指腸粘膜よりも低く、多様性は膵臓FNA検体と十二指腸粘膜では組成が異なることが示された。これらの結果からそれぞれの採取部位における細菌叢の分布は異なることが示された。また、膵内の原発巣部位や制酸剤の使用による多様性の偏りは認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果により、EUS-FNAにより膵臓腫瘍内細菌が検出可能と判明した。今後、血液検査所見、画像検査所見、病理学的所見、治療情報・アウトカム等との関連を検討する。それらの結果から、手術非適応症例に対する化学療法の有効性と腫瘍内細菌叢の関連の検討が可能であり、適切な薬剤選択や、細菌叢に対する治療と膵臓治療アウトカムの検討などが今後の目標である。これらの検討や治療開発により、予後不良な膵臓の治療成績の向上が期待される。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer tumor specimens were collected from 30 patients between May 2019 and March 2020. To investigate the origin of intratumoral bacteria, at the time of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration (EUS-FNA) specimen collection, gastric and duodenal mucosa were also collected simultaneously, totaling 90 specimens. Analysis was successful in 80% of pancreatic cancer EUS-FNA, in 100% of gastric mucosa, and in 97% of duodenal mucosa. The alpha diversity in pancreatic cancer FNA specimens was lower than that in gastric and duodenal mucosa, and examination of beta diversity showed that the composition was different in pancreatic cancer FNA specimens and duodenal mucosa. These data showed that the distribution of bacterial flora in each collection site was different. In addition, there was no bias in the diversity of the primary lesions in the pancreas or the use of antacids.

研究分野：医学

キーワード：腫瘍内細菌叢 膵臓癌 超音波内視鏡下針生検

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は全癌腫の中でも最も予後不良である。切除不能な進行癌においては、標準治療である FOLFIRINOX 療法と Gemcitabine + nab-Paclitaxel 療法も生存期間中央値 8-13 ヶ月程であり、十分な治療成績とは言えない。

近年、細菌が様々な疾患の発症や治療効果に関わる因子として注目されている。腸内細菌は代謝物を介して免疫や内分泌システム、神経系 (gut-brain axis) にシグナルを送り、肥満、炎症性疾患、神経疾患などと関連性が示唆されている。悪性腫瘍においては局所のバリア機構や代謝免疫系の修飾を介して、がんの発生、進行・転移との関連性が報告されている。

腸内細菌と免疫チェックポイント阻害薬 (immune checkpoint inhibitor : ICI) の有効性について検討した報告では、非小細胞肺癌、悪性黒色腫、腎細胞癌において、ICI の奏効例と腸内細菌叢の多様性が、また報告により異なるが *Akkermancia muciniphila*, *Bifidobacterium longum*, *Collinsella aerofaciens*, *Enterococcus Faecium*, *Ruminococcaceae* family など特定の菌種を認める症例と奏効例の相関が報告されており、ICI の有効性と腸内細菌の関連性が示唆されている¹⁾²⁾³⁾。また、殺細胞性抗癌剤の抗腫瘍効果と細菌の関連性についても *Fusobacterium nucleatum* が TLR4 や MYD88 を介して自然免疫シグナルに影響しオートファジー経路を活性化しアポトーシスを防ぐことで化学療法への抵抗性を与えるという報告や、Vit.B6、Vit.B9 や RNA を介した経路の修飾を介して 5-FU の宿主に対する効果に影響を与える報告、germ-free mouse や抗菌薬を投与されたマウスでは白金製剤である Oxaliplatin(L-OHP)投与後の活性酸素産生および細胞毒性が減弱され、腸内細菌叢の存在と L-OHP の有効性と関連性を示唆する報告などがある⁴⁾⁵⁾⁶⁾。

膵臓癌においても腫瘍内細菌と化学療法の有効性の関連性を示唆する報告がなされている。マウス腫瘍モデルにおいて、主に *Gammanoproteobacteria* 網に属する菌種が持つ細菌酵素である Citidine deaminase (CDD) の作用にて Gemcitabine を 2'2'-difluorodeoxyuridine に代謝・不活化することで抗腫瘍効果を減弱させることが示された。Gemcitabine は膵臓癌の key drug であるが単剤では奏効率 10%程度であり、腫瘍内細菌が限定された抗腫瘍効果に影響を与えている可能性が考えられた⁷⁾。

膵組織における細菌の有無について膵臓癌患者および非膵臓癌患者の膵臓手術検体を用いて検討を行ったところ、膵臓癌患者では 76%で腫瘍内細菌を検出したと報告されている⁷⁾。これは非膵臓癌患者の膵臓検体における膵臓内細菌の検出率 15%に比べて有意に高値であった。また、検出された菌種は多くが前述した *Gammanoproteobacteria* 網であった。*Gammanoproteobacteria* 属は十二指腸内の常在菌とされており、膵管を経由して組織内に移行したと推測された。膵癌手術検体から細菌培養に成功した 15 例において、マウス腫瘍モデルに投与した結果、93%(14/15 例)で Gemcitabine に対する耐性が出現したと報告されている⁷⁾。

2. 研究の目的

膵臓癌組織では非膵臓癌組織よりも高頻度で腫瘍内細菌が存在しており、その存在の有無が膵臓癌治療の key drug である Gemcitabine の有効性に関連する可能性が示唆された⁷⁾。しかしながら、現在のところ腫瘍内細菌と化学療法の有効性について臨床的に検討した研究はない。その理由の 1 つとして、既報では腫瘍内細菌の検出のために手術検体を用いているが、実地臨床において化学療法を行う対象である進行膵癌においては、手術適応がないため手術検体を入手することが困難であることが挙げられる。

近年、日常診療では超音波内視鏡下針生検 (endoscopic ultrasound-fine needle aspiration : EUS-FNA) により膵腫瘍を穿刺し、採取された生検検体を用いて組織病理学的証拠を得ることにより、手術療法、化学療法などの治療選択を行っている。また、EUS-FNA による膿瘍穿刺ドレナージにより、膿瘍内の細菌を検出することは一般的に行われている。

腫瘍内細菌と化学療法の有効性との関連性など臨床的意義を検証するには、EUS-FNA 検体から腫瘍内細菌の情報を得ることが望ましいが、EUS-FNA 検体から腫瘍内細菌を検出できるか検討した研究は現在までのところ報告されていない。

以上より、本研究は、これまでに報告されていない、EUS-FNA 検体による膵臓癌腫瘍内細菌検出の可能性を明らかにすることを目的としている。検出可能と判断された際には、腫瘍内細菌と化学療法の有効性の関連を検討することを探索的研究として検討する。

3. 研究の方法

(1) 研究対象者から取得する試料の種類とその採取方法とその測定項目

利用する試料および方法

北海道大学病院消化器内科で、膵臓癌の病理診断目的に EUS-FNA を施行し得られた検体を使用する。胃内および十二指腸走査で腫瘍を穿刺する前に胃内走査で胃液、十二指腸走査で十二指腸液を採取する。その後、下記の方法で EUS-FNA を施行し検体を得る。検体は採取後速やかに-80 液体窒素にて保存し、北海道大学消化器内科医局にて冷凍保存する。

EUS-FNA の方法

経口的に超音波内視鏡 (UCT-260 or UCT-240, Olympus medical systems 社製) を挿入し、経消化管的 (胃、十二指腸) に標的病変を描出し、EUS-FNA 穿刺針を用いて標的病変を穿刺する。EUS-FNA 穿刺針の種類は本試験では特に規定せず、術者判断で状況に合わせて選択する。得られた検体はスタイレットを用いてスライドグラス上で穿刺針外に押し出し、白色検体の有無を確認する。原則として検体の一部を用いて迅速細胞診を行い、目的とした検体が採取できたかを確認する。本研究は 1 回目の穿刺で得られた白色検体のみを評価する。

測定項目

採取検体より核酸抽出を行い 16S rRNA 領域プライマー設計及び PCR 増幅によるライブラリーを作成する。次世代シーケンサーを用いて配列解析を行い、得られた配列を用いて 16S rRNA データベースに対する相同性検索および系統分類解析を実施する。採取検体に含まれる細菌の種類および割合などを解析する。

(2) 目標症例数の設定

設定根拠としては、前述の既報では膵臓癌検体からの細菌検出率は 76%、対照 (非癌症例) では 15%であった。しかし、これらはいずれも手術検体からの検出率であり、FNA 検体は検体量が少なく検出率は下がる可能性がある。FNA にて腫瘍内の細菌叢を検出した既報はないため、期待値を 67.5% (手術検体での検出率の 90%)、閾値を 37.5% (手術検体での検出率の 50%) との想定の下、二項分布による検定による 0.05、検出力 80%として、必要なサンプルサイズを算出すると 25 例となった。本試験では若干の脱落を考慮して 30 例とした。

(3) 観察及び調査項目とその実施方法

以下の項目について、研究対象者の診療録から情報を入手し利用する。 から については EUS-FNA 前および後の情報とし、 については膵臓癌治療開始後の情報とする。これらはすべて日常診療で実施される項目であり、その頻度も日常診療と同等である。

対象者基本情報：年齢、性別、臨床病期 (UICC7 版に準拠)、Performance status、原発部位、転移臓器、腹部手術歴、1 ヶ月以内の抗生剤使用歴

血液検査所見：血液学的検査 (白血球数、好中球数、ヘモグロビン、血小板数)、血液生化学的検査 (AST、ALT、T-Bil、ALP、血清 Cr、Na、K、CRP)、腫瘍マーカー (CEA、CA19-9)

画像検査：主に CT 検査、必要に応じて MRI、PET-CT 検査も参照する

EUS-FNA 検体の病理学的所見：組織型、分化度、免疫組織化学的所見など

治療情報：手術症例であれば手術日、術後 Stage、術後補助化学療法、無再発生存期間など、放射線療法であれば放射線照射量、部位、併用化学療法の有無、化学療法症例であればレジメン、無増悪生存期間、全生存期間、奏効率、有害事象、など

4. 研究成果

2019 年 5 月から 2020 年 3 月までの間に予定の 30 症例から膵臓腫瘍検体を収集した。腫瘍内細菌の由来を検討するため、EUS-FNA 検体採取時に、胃粘膜・十二指腸粘膜も同時に収集し、合計 90 検体が収集された。

採取検体より核酸抽出を行い 16S rRNA 領域プライマー設計及び PCR 増幅によるライブラリーを作成した。引き続き、次世代シーケンサーを用いて配列解析を行い、得られた配列を用いて 16S rRNA データベースに対する相同性検索および系統分類解析を実施し、検体に含まれる細菌の種類および割合などを解析した。

(1) 30 症例中、膵臓 FNA 検体は 24 例 (80%)、胃粘膜は 30 例 (100%)、十二指腸粘膜は 29 例 (97%) でメタゲノム解析のためのシーケンスが可能であった。膵臓 FNA 検体で解析可能であった症例と解析不可能症例について臨床的因子に有意な偏りは認めなかったが、体尾部癌 ($p=0.15$)、胃からの穿刺 ($p=0.18$)、制酸薬の使用 ($p=0.18$) が解析不可能例に多い傾向であった (表 1)。

膵臓細菌叢は十二指腸乳頭から侵入すると考えられており、体尾部癌には細菌が到達しにくい可能性がある。また、制酸薬は腸内細菌叢に影響するため、十二指腸細菌叢への影響を介して膵臓細菌叢の形成にも関連する可能性がある。

表 1：解析可能例と不可能例の比較（全 30 例）

		解析不能（6 例）	解析可能（24 例）	P 値*
性別	男性 / 女性	2 / 4	9 / 15	1.00
原発巣部位	頭部 / 体部または尾部	2 / 4	17 / 7	0.15
切除可能分類	可能または境界 / 不可能	3 / 3	12 / 12	1.00
減黄ドレナージ	あり / なし	1 / 5	5 / 19	1.00
穿刺部位	胃 / 十二指腸	4 / 2	8 / 16	0.18
糖尿病	あり / なし	1 / 5	9 / 15	0.63
制酸剤の使用	あり / なし	1 / 5	13 / 11	0.18

* カイ二乗検定

(2) 細菌叢の多様性については、胃・十二指腸検体に比べて有意に低い傾向であった (図 1)。

多様性では主座標分析を行い、unweighted UniFrac distance、weighted UniFrac distance で膵癌は胃、十二指腸と有意差を認めた。系統分析では、門レベルの組成で膵癌は胃・十二指腸に比べて *Proteobacteria* 門が優位に多い一方で、*Bacteroidete* 門、*Firmicutes* 門は有意に少ない傾向であった。

以上の結果から、膵癌細菌叢は胃・十二指腸細菌叢と比べて多様性や組成が異なる集団であることが明らかとなった。

Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) にて属レベルで特徴的な細菌の解析を行い、膵癌検体では胃・十二指腸検体に比べて *Acinetobacter* 属、*Pseudomonas* 属など *Gammaproteobacteria* 網に属する細菌を多く認めた。これは既報に矛盾しない結果である。

(3) サブグループ解析として、切除可能膵癌と切除不能膵癌の細菌叢を比較検討した。切除可能膵癌、切除不能膵癌において多様性、多様性で有意差を認めず、門レベルで主要な細菌 (*Proteobacteria*、*Firmicutes*、*Bacteroidota*、*Actinobacteria*) の組成比に有意差を認めず、進行の程度により大きな変化は認めなかった。LEfSe では、切除可能膵癌で *Delftia* 属を多く認めていた。切除不能膵癌で有意に増加している細菌は認めなかった。また、胃・十二指腸細菌叢は切除可能膵癌に比べて切除不能膵癌で

多様性が低下傾向であった。EUS-FNA 穿刺部位による膵癌細菌叢の組成は、主要な門レベルで有意差を認めなかった。

既報では膵癌患者と対照患者の十二指腸細菌叢を比較したところ、膵癌患者の十二指腸で *Delftia* 属を多く認めており、膵癌の発生・早期の進展に関連する可能性がある。また、進行膵癌では背景消化管の多様性が低下していることが示唆された。進行膵癌では経口摂取不良、それによる食習慣の変更などを背景に消化管のフローラが乱れ *dysbiosis* が生じている可能性がある。その臨床的な意義は不明だが、前述の如く膵癌細菌叢は消化管由来と思われるため、膵癌細

多様性 (Shannon index、Observed features) は膵癌検体

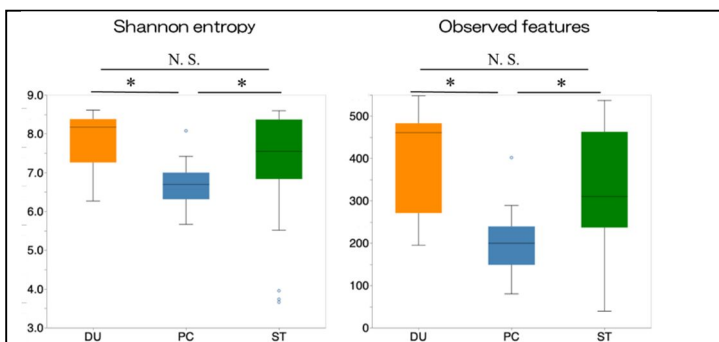


図 1：膵癌、胃、十二指腸フローラの多様性

膵癌フローラは胃・十二指腸より有意に多様性が低い。

DU, duodenum; PC, pancreatic cancer; ST, stomach

* : 有意差あり

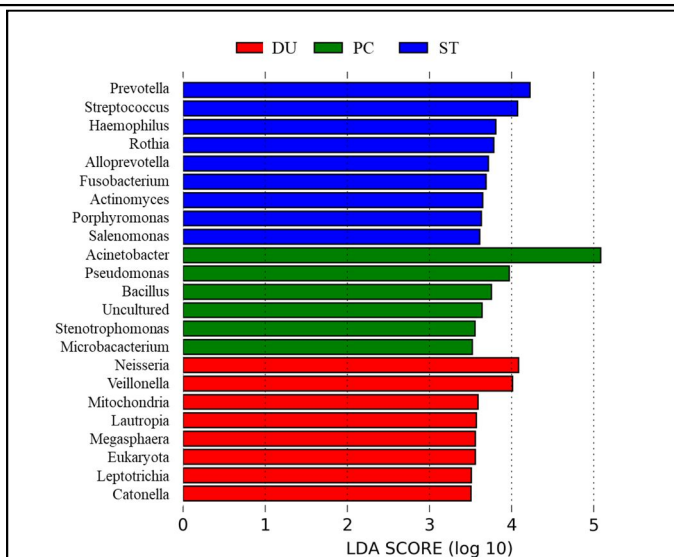


図 2：LEfSe 解析による生検部位ごとに特徴的な細菌 (属レベル)

膵癌フローラは *Acinetobacter* 属、*Pseudomonas* 属などを特徴的に認めた。

DU, duodenum; PC, pancreatic cancer; ST, stomach

菌叢との関連性や臨床的アウトカムに関連する可能性がある。

(4)本研究の Limitation として、EUS-FNA は胃または十二指腸の壁を貫いて深部臓器である膵臓内の膵腫瘍を生検する手技であり、胃または十二指腸の細菌叢がコンタミネーションする可能性が否定できなかった。本研究の結果では、膵癌細菌叢は胃、十二指腸細菌叢と比べて多様性が異なり、細菌叢の集団として異なること、また門レベルの組成において膵癌細菌叢と胃・十二指腸細菌叢は大きな偏りがあること、本研究で得られた膵癌細菌叢は *Proteobacteria* 門が優位であり既報と比べて矛盾がない結果であったこと、穿刺部位が胃および十二指腸からであっても門レベルで細菌叢に偏りを認めなかったこと、から EUS-FNA 検体で得られた検体からの膵癌細菌叢の解析結果には大きなコンタミネーションはなく、信頼できる解析結果であると判断した。

本研究の結果により、EUS-FNA により膵癌腫瘍内細菌が検出可能と判明した。今後、血液検査所見、画像検査所見、病理学的所見、治療情報・アウトカム等との関連を検討する。それらの結果から、手術非適応症例に対する化学療法の有効性と腫瘍内細菌叢の関連の検討が可能であり、適切な薬剤選択やそれによる予後の改善、細菌叢に対する治療と膵癌治療アウトカムの検討などが今後の目標である。

【引用文献】

- 1) Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*. 2018;359(6371):91-7.
- 2) Matson V, Fessler J, Bao R, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science*. 2018;359(6371):104-8.
- 3) Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 2018;359(6371):97-103.
- 4) Yu T, Guo F, Yu Y, et al. *Fusobacterium nucleatum* Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. *Cell*. 2017;170(3):548-63.e16.
- 5) Scott TA, Quintaneiro LM, Norvaisas P, et al. Host-Microbe Co-metabolism Dictates Cancer Drug Efficacy in *C. elegans*. *Cell*. 2017;169(3):442-56.e18.
- 6) Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, et al. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science*. 2013;342(6161):967-70.
- 7) Geller LT, Barzily-Rokni M, Danino T, et al. Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science*. 2017;357(6356):1156-60.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shintaro Nakano, Yasuyuki Kawamoto, Kazuaki Harada, Ken Ito, Rika Saito, Takahiro Yamamura, Satoshi Yuki, Hajime Hirata, Ryutaro Furukawa, Yunosuke Takishin, Kousuke Nagai, Masaki Kuwatani, Yoshito Komatsu, Naoya Sakamoto
2. 発表標題 Evaluating the intratumor microbiome of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) by analyzing the fresh frozen tissues obtained by endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration (EUS-FNA)
3. 学会等名 ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shintaro Nakano, Yasuyuki Kawamoto, Yoshito Komatsu, Kazuaki Harada, Ken Ito, Rika Saito, Takahiro Yamamura, Satoshi Yuki, Masaki Kuwatani, Hajime Hirata, Ryutaro Furukawa, Yunosuke Takishin, Kousuke Nagai, Naoya Sakamoto
2. 発表標題 Intratumor microbiome analysis of pancreatic cancer with tissues obtained by EUS-FNA
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------