

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18162

研究課題名（和文）膵癌患者における口腔内細菌叢の網羅的検索による新たな診断方法・予後解析の確立

研究課題名（英文）New diagnostic method and prognostic analysis by comprehensive search of oral microbiota in patients with pancreatic cancer

研究代表者

北畑 裕司（Kitahata, Yuji）

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00535338

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）：膵癌に対する早期発見・診断のためのツール・バイオマーカーの同定、予後評価指標の確立を目標として、本研究を開始した。膵癌患者と健常者における口腔内細菌叢の比較を施行した。結果として、膵癌患者においては、免疫能を反映した結果と考えられるある細菌叢や歯周病に関連する *Veillonella* 属や *Selenomonas* 属などの細菌が有意に増加していることが判明した。口腔ケア後は、これらの細菌叢は変化するが、口腔ケア中止により容易に細菌叢は変化する事が判明した。口腔内細菌叢と腸内細菌叢には多くの共通菌種が認められたが、膵癌患者において、系統だった共通の菌種は見いだせなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、新規膵癌早期診断法が確立されたならば、膵癌患者を診断から治療まで、一貫して高いレベルで治療することが可能である。本研究はこれまでにないアプローチから得られた知見を基に、膵癌に対する治療戦略をさらに発展したものにつなげていくことが可能であることを示唆している。この結果を踏まえ、新規膵癌診断・治療戦略として、口腔内細菌叢を活用することを今後も追及していく考えである。本研究目的である、早期診断・治療・予後解析が可能となれば、予後不良である膵癌に対する新たな予後改善の方策が確立されることで社会貢献できる。

研究成果の概要（英文）：This study was started with the goal of identifying tools and biomarkers for early detection and diagnosis of pancreatic cancer and establishing prognostic evaluation indicators. We compared the oral flora between pancreatic cancer patients and healthy subjects. As a result, in pancreatic cancer patients, it was found that bacteria such as *Veillonella* spp. After oral care, these bacterial flora changed, but it was found that the bacterial flora changed easily when oral care was discontinued. Many common strains were found in the oral and intestinal flora, but no systematic common strain was found in pancreatic cancer patients.

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 口腔内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

日本膵臓学会膵癌登録 20 年総括によると、本邦での膵癌の約 8 割は stageIV の最も進んだ状態で見つかることとされている。膵癌においては、たとえステージ I で診断されたとしても、その治療成績は、未だに不良である。同報告によると、膵癌症例の治療成績 (5 年生存率) は、stageI : 57%、stageII : 44%、stageIII : 24%、stageIVa : 11%、stageIVb : 3%である。このような難治性癌の代表ともいえる膵癌で、唯一、予後に関して明るいのは、がんが膵管上皮に限局している場合(stage0)である。その 5 年生存率は、ほぼ 100%期待できるとされている。しかし、現在、実地医療においては、膵管上皮に限局した早期膵癌を発見することは、検査機器の発達や検診ツールが改善したとはいえ、胃癌や大腸癌などの他の消化器癌とは違い容易なことではない。膵癌においては、現段階で早期発見・診断のためのツール・バイオマーカーの同定、予後評価指標などは確立しておらず、膵癌治療の喫緊の課題となっていることは明白であり、我々、膵臓外科医にとっては、忸怩たる思いである。

一方、口腔内細菌叢と糖尿病、誤嚥性肺炎、細菌性心内膜炎、早産や低体重児出産など、全身性疾患との関わりが指摘されて久しい。特に、最近では食道癌、大腸癌など消化器系癌の癌化・増殖との関連が数多く報告されている。膵癌においても、口腔衛生状態の不良すなわち口腔細菌叢の悪化が病期進行に関与するとの報告がなされた(Int J Cancer, 2016)。口腔内細菌が何らかの形で、膵癌の増殖・進展に関与することが示唆されている。このような学術的背景を基に、本研究では、(1)「膵癌患者における口腔内細菌叢の同定」、(2)「口腔ケアによるこれら細菌叢の変化の追跡」、(3)「口腔内と膵癌組織の細菌叢の相関解析」を目的とし、次世代シーケンサーを用いて、未同定の菌を含むすべての菌種を同定することで、これまで、予後不良・難治性癌の代表とされてきた膵癌に対する新たな早期診断・治療・予後解析の確立から、新たな側面からのオーダーメイド医療の可能性の追求を目的とした。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、膵癌患者における口腔内細菌叢の特徴や関連性を解明し、膵癌の新しい診断方法および原因菌に対応したオーダーメイド治療を確立することである。

膵癌のリスク因子の特定: 膵癌患者と健常人との口腔内細菌叢を比較検討することで、口腔内細菌叢の組成が膵癌の発症リスクと関連しているかを検討する。また、口腔内細菌叢の特定の組成が膵癌のリスク因子として機能しているかどうかを検討する。

早期発見のためのバイオマーカーの確立: 口腔内細菌叢の変化は、さまざまな疾患の発生や進行に関与していることが知られている。そのため、口腔内細菌叢と膵癌の関連性を解明することで、膵癌の早期発見のためのバイオマーカーの確立を追求する。

治療効果の向上: 口腔内細菌叢は、免疫応答や炎症反応に関与することが報告されている。膵癌治療において、口腔内の細菌叢の状態が、化学療法中や根治術後の治療効果に影響を及ぼす可能性があると考えられる。そのため、膵癌患者の治療中の口腔内細菌叢の状態を評価し、治療効果を向上させるための戦略を開発する。

3. 研究の方法

本研究を遂行するにあたり、主に以下の 4 つの研究項目を検討する予定とした。

- (1) 膵癌患者と健常人における口腔内細菌叢の比較
- (2) 膵癌患者における口腔ケアによる経時的な細菌叢の変化
- (3) 次世代シーケンサーを用いた未同定菌の同定と細菌叢の正確な解析
- (4) 膵癌の原因菌に対するオーダーメイド治療とその経時的な治療効果の評価

本研究は膵癌患者の口腔内と腸内環境の網羅的解析を試みるもので、これまで同様の手法での研究は全く報告されておらず、独自の視点に立った極めて独創的なものである。従来の研究成果を考えると膵癌の発症や重症度には未同定の細菌が関与している可能性が高く、治療抵抗性の菌に対しても、オーダーメイド治療への応用が期待できると考えた。

本研究における独創性のひとつに、次世代シーケンサーを用いた細菌叢の同定と解析がある。原因菌を始め、これまでの細菌叢の検索には、主に培養検査法が用いられてきた。しかしながら、この方法では特殊な培地が必要な菌や培養に時間を要する菌もあり、検体内の菌を網羅的に把握できず迅速な検索とは言えなかった。今回、我々は検体から細菌の DNA を抽出し、次世代シーケンサー (MiSeq; Illumina 社) を用いた菌種および菌叢の解析を行う計画とした。この方法においては、培養時間や培地選択などの培養条件による検出感度の差異はなく、迅速かつ網羅的に検体中の菌種および菌叢を同定できると考えられた。本研究では、次世代シーケンサーを用いることにより、細菌特有の 16S rRNA と真菌特有の ITS 領域をコードする遺伝子をプライマーとして利用することから、従来の培養法の最大の問題点であった培養が必要で、「各菌で成長速度が異なり、正確に口腔内の細菌叢を反映できない」ことを払拭できると考えられた。さらに、未同定の細菌の DNA 断片を一度に解析・同定することができる。このため、膵癌の早期診断法やオーダーメイド治療の確立に応用できると考えられた。さらに次世代シーケンサーは、従来の方法では見逃していた低発現量の遺伝子転写産物の補足も可能であり、未同定真菌の同定

とより正確な細菌叢の把握が可能となる。従来のクローニングからシーケンサー解析までの作業が省略され、解析処理の時間を大幅に短縮できるという画期的な解析方法である。この方法を駆使して、未同定の細菌についても同定を進める計画を立てた。

上述(1)～(2)で病原菌として抽出された細菌のうち、未同定のものについては、次世代シーケンサーにて塩基配列を解読、さらに、BLAST nucleotide algorithm を用いて、nucleotide collection database から該当する塩基配列に相当する菌種を検索し、原因菌の同定を行う予定とした。

4. 研究成果

(1) 膵癌患者と健常者における口腔内および腸内、膵癌組織内の細菌・真菌叢の比較

口腔粘膜・う蝕・歯周組織の診査を行い、唾液・歯垢、また糞便を採取した。

膵癌患者においては、通常の治療における採血の一部や、手術で摘出される膵癌の組織の一部を採取した。口腔内および腸内、膵癌組織内の細菌・真菌叢を比較検討することで、膵癌患者における特徴的な細菌・真菌叢の同定を行った。

結果として、膵癌患者においては、担癌状態である免疫能を反映した結果と考えられるある一定の細菌叢群や歯周病に関連する *Veillonella* 属や *Selenomonas* 属などの細菌が有意に増加していることが判明した。

(2) 膵癌患者における手術療法、化学療法および口腔ケア前後の細菌・真菌叢の変化

膵癌治療前後に歯垢および唾液を採取し、治療による細菌叢の変化を検討した。結果、病原細菌や治療判定・評価に有用な細菌の抽出を行い、解析を行った。

口腔ケア後には、膵癌患者における細菌叢は変化するが、口腔ケア中止により、容易に細菌叢は当初の状態に戻るなど変化することが判明した。さらに、その細菌叢群は、口腔ケア前後で、特徴的なものは同定できなかった。手術療法前後に関しても、大きな差異は認められなかった。化学療法前後に関しては、解析に耐えうる十分な検体を得ることができなかった。いずれにしろ、口腔内細菌叢採取・解析のタイミングが、研究結果に非常に影響を及ぼすことが判明した。このことから、本項目においては、特徴的な結果が得られる期待は少ないと考えられた。

(3) 次世代シーケンサーを用いた未同定細菌・真菌の同定と細菌・真菌叢のより正確な解析

口腔内細菌叢と腸内細菌叢には多くの共通菌種が認められたが、膵癌患者において、系統だった共通の菌種は、見いだせなかった。さらに腸内細菌叢においては、化学療法の有無等にも影響されることが示唆された。これらの結果からは、患者個人の免疫的な背景、治療経過、腫瘍の状況や口腔内病変の追加解析が必要と考えられた。いずれにしろ、患者個人によるオーダーメイドな解析が必要であると考えられ、一定数の患者・検体確保が必要と考えられた。

(4) 膵癌患者の早期発見およびオーダーメイド治療とその経時的な治療効果の評価

蓄積した口腔および腸内環境の解析結果をもとに、口腔ケアや手術療法、化学療法を含む治療法について、治療効果については、今後、予後解析を含め、前向き検討を行っていく予定である。しかし、この検討に関しては、患者登録数が当初の予定より大幅に減少したため、慎重に見極める必要があると考えている。

膵癌に対する早期発見・診断のためのツール・バイオマーカーの同定、予後評価指標の確立を目標として、本研究を開始した。早期発見は、膵癌治療の喫緊の課題である。本研究では(1)「膵癌患者における口腔内細菌叢の同定」、(2)「口腔ケアによるこれら細菌叢の変化の追跡」、(3)「口腔内と膵癌組織の細菌叢の相関解析」を主要課題として、膵癌の新たな診断・治療・予後解析の確立を目指した。本研究の解析は、次世代シーケンサーを用いた未同定菌の同定と細菌叢の正確な解析を特徴とした。しかし、研究開始から COVID19 によるパンデミックの状況に社会が陥った。口腔内細菌叢を採取するという本研究の特性上、どうしても検体採取ができない時期が長く続いたため、本研究の進捗に大きな影響を与えた。そのため、当初予定していた検体数の確保が、研究期間内ではできず研究期間を延長するに至った。しかし、COVID19 の流行は収束せず、研究の規模自体を縮小せざる得なくなった。そのため、十分な解析に至らず、当初予想した解析ができない箇所が発生したことは事実である。しかしながら、少ないなかでの、解析・検討においても、有望な研究結果も認められている。本研究が、トリガーとなり膵癌患者に、希望をもたらすことは十分に可能であると考えている。

今後は、早期発見・診断のためのツール・バイオマーカーを追求するために、患者別の原因菌の同定と口腔ケアを含めた効率的な治療体系の確立を目指す。つまり、膵癌をターゲットとした早期発見・オーダーメイド治療を実施し、この研究で得られた結果を社会に還元する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------