

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：37114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2023

課題番号：19K24057

研究課題名（和文）癌進展に関わる乳癌患者腸内細菌叢と宿主微小環境構築の相互作用解明

研究課題名（英文）Exploration of reciprocal interactions between gut microbiota and host microenvironment

研究代表者

和田 寛也（Wada, Hiroya）

福岡歯科大学・口腔歯学部・臨床教授

研究者番号：70851509

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：腸内細菌叢のdysbiosisは、炎症性腸疾患などの消化管疾患のみならず、消化管外が標的となる関節リウマチや多発性硬化症などの全身性自己免疫疾患の発症に影響を及ぼすと考えられている。本研究では、非消化器がんの乳癌患者細菌叢の発癌・進展、腫瘍内微小環境並びに宿主の癌免疫応答へ及ぼす影響をTCGA及びBICデータベースを併用し、特に大腸癌との比較においてメタゲノム解析した。乳癌患者に検出される細菌叢は大腸癌患者の細菌叢と異なっていた。T細胞応答を増強すると考えられるBifidobacterium属の相対的高占有率及びPrevotella属の相対的低占有率と乳癌患者の良好な予後との相関が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、我々の検討にて、乳癌患者に検出される細菌叢は大腸癌患者の細菌叢と異なっており、T細胞応答を増強すると考えられるBifidobacterium属の相対的高占有率及びPrevotella属の相対的低占有率と患者予後との相関が得られたこと及び各々の細菌属は他の細菌属とのネットワークを形成していることから、適切なprobiotics投与などによって、特にICI等の治療効果の増強やcancer promotionの抑制等に影響を及ぼし、乳癌患者の予後改善に寄与できる可能性が示唆されたことは意義深いと考える。

研究成果の概要（英文）：Gut microbial dysbiosis affects the occurrence of gastrointestinal diseases, such as inflammatory bowel diseases, and systemic autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis and multiple sclerosis. Here, we performed metagenomic analysis of breast cancer patients as a non-gastrointestinal tract cancer, which affects carcinogenesis, cancer promotion, tumor microenvironment, and host cancer immunological response, especially as compared with colon cancer patients, using the TCGA and BIC databases. As a result, the microbial flora in breast cancer patients differs from that in colon cancer patients. The high relative abundance of the Genus Bifidobacterium, which is thought to enhance T-cell response, and low relative abundance of Genus Prevotella, are correlated with better prognosis in breast cancer patients.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：メタゲノム解析 乳癌 腸内細菌 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管内には 100 兆個を超える腸内細菌が存在し、糞便 1g あたり約 1000 億という高密度で細菌が息している。これらの腸内細菌叢あるいは腸管内に侵入した病原体に対する防御機能に重要なものが腸管免疫である。この腸管免疫は腸内細菌叢と量的・質的にバランスを保っており、dysbiosis と呼ばれる腸内細菌叢の恒常性の変容は、腸管免疫応答の恒常性をも崩し、炎症性腸疾患などの消化管疾患のみならず、消化管外が標的となる関節リウマチや多発性硬化症などの全身性自己免疫疾患の発症に影響を及ぼすと考えられている^{1, 2}。更に、近年の DNA シーケンシング技術の急進展によって、メタゲノム解析技術が可能となり、培養を介さずにサンプル中の希少な微生物を含めた網羅的解析により、徐々に健常人のマイクロバイオームの全貌が明らかとなってきた。そんな中、Tanoue らは、健常人由来の糞便より、感染症及び抗腫瘍免疫に重要な IFN- γ 産生性 CD8 T 細胞誘導に重要な希少な 11 種類の腸管内細菌を同定した³。このことは、これまであまり関連性が検討されていなかった腸管外の CD8T 細胞応答と宿主の腸管細菌叢との相関を明らかにしただけでなく、限られた既知の probiotics だけではなく、他の希少な細菌群をも宿主の有益な免疫応答誘導の標的となることを示唆するものである。これまでの研究では健常人の糞便より同定された菌体を使用したもので、実際の癌患者の腸内細菌叢が報告通りの機能をもっているのか、また、別種の細菌叢が癌患者の発癌及び抗腫瘍免疫応答に関連しているのか、また、宿主細菌叢がどのような機序で癌微小環境及び腫瘍免疫に影響を与えているのかは不明である。現在の所、乳癌患者細菌叢の発癌・進展、腫瘍内微小環境並びに宿主の癌免疫応答へ及ぼす影響は十分に明らかとなっていない。

一方、近年の悪性腫瘍に対する治療の中で、目覚ましい進歩を見せている抗腫瘍免疫療法は、Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen (CTLA)-4、PD-1 ligand (PD-L1 (B7-H1)、PD-L2(B7-DC)や Programmed Death-1 (PD-1)分子⁴などの免疫応答のブレーキ作用を解除することによって、個体の抗腫瘍免疫応答、特に細胞傷害性 T 細胞(CD8 T 細胞)の活性化を促し、進行悪性腫瘍の治癒が期待できる治療法である。臨床的にも、PD-1 リガンドはヒトの癌組織に発現し、乳癌、卵巣癌、悪性黒色腫、食道癌、腎細胞癌、膵臓癌、肝癌および尿路上皮癌などの癌では、切除した癌組織における PD-1 リガンドの発現と術後の生存期間との間に負の相関関係が認められる。実際に PD-1/PD-L1 シグナルの阻害により、頭頸部扁平上皮癌、悪性黒色腫、腎細胞癌、肺非小細胞性肺癌、卵巣癌、消化管癌、肝癌および尿路上皮癌等の一部の症例で、驚異的な持続的臨床効果を認めることが報告されている⁵。特に Programmed cell death-1 (PD-1)/PD-1 ligand-1 (PD-L1)阻害剤の効果は腫瘍内にリンパ球が高度に浸潤する亜型や microsatellite instability(MSI)が高く、変異によって cancer neoantigen を産生しやすい癌腫において有効とされている^{6, 7}。外科関連腫瘍のうち、非消化器癌である乳癌は、複数のサブタイプに分類され、実地の臨床では、少なくとも Luminal A、Luminal B・HER2 陰性、Luminal B・HER2 陽性、ホルモン受容体陰性・HER2 陽性、トリプルネガティブ(TNBC)の 5 つに分けられ、個々のサブタイプによってホルモン療法、化学療法、抗 HER2 療法が適応となるが、特に TNBC は ER, PgR, HER2 がすべて陰性であり、内分泌療法や抗 HER2 療法の効果が期待できない上、予後不良で、新規治療法の開発が必要なサブタイプである。また、The Cancer Genomic Atlas project(TCGA)等の種々のがんの大規模遺伝子データベースを免疫応答に注目して遺伝子プロファイルした研究では、様々な癌は癌種を超えて、IFN- γ dominant、Wound healing、Inflammatory、Lymphocyte-depleted、Immunologically quiet、TGF- β dominant の 6 サブタイプ(免疫関連サブタイプ)に分けられるが、乳癌は他の癌腫に比較し、⁸ のリンパ球が浸潤している免疫優勢サブタイプの多い癌腫であり、中でも IFN- γ dominant が多いことが報告されている⁸。従って、免疫療法の良い標的癌腫であると考えられ、実際、PD-1/PD-L1 シグナル阻害剤の TNBC に対する phase I の臨床試験では、許容安全性に加え、単独療法で 18.5%、化学療法との併用療法で 38%の腫瘍縮小奏率が報告されている。

2. 研究の目的

以上を背景に、本研究では、TCGA 及び BIC データベースを併用し、特に大腸癌との比較において、非消化器癌であるヒト乳癌患者のメタゲノム解析を施行、乳癌患者において検出される細菌叢のプロフィールを同定し、腫瘍内微小環境並びに乳癌患者の予後に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

(糞便検体の採取及び DNA 抽出とメタゲノムシーケンス)

「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」にもとずいた倫理審査委員会にて審査・承認のもと、臨床研究にエントリーした術前の乳がん患者及び健常人から DNA 保護材を含む専用容器にて糞便を採取し、-80 にて検体を保存した。同検体より QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit を用いて、DNA を抽出した。抽出された DNA は Illumina HiSeq あるいは MiSeq プラットフォームにてシーケンスを行い、CLC Microbial Genomics Module plugin 搭載の QIAGEN CLCGenomics premium にて解析を施行した。

(TCGA 及び BIC database を用いたメタゲノム解析)

The NCI Genomic Data Commons から抽出された TCGA miRNA-Seq BAM file 及び clinicopathological data をダウンロードし、SAMtool を用いて unmapped reads を抽出、FASTQ file を作製、細菌及び細菌叢の reference genome を用いて、mapping を施行し、様々な taxonomic level で read matrix を形成した BIC database を利用し、乳がん及び大腸癌の microbiome profile データを得た⁹。

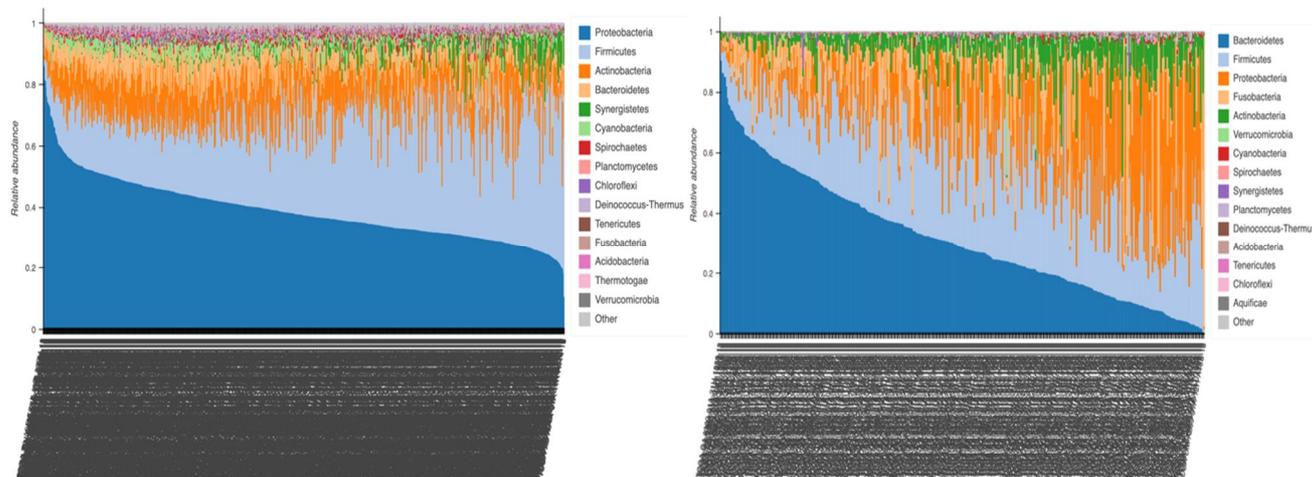
(統計解析)

細菌叢の alpha 多様性は、Shannon index, 遺伝子発現との相関は Fisher's z-transformation を用いた Spearman correlation coefficient (SCC) 検定、また、生存曲線は log-rank test を用いて統計解析を施行した。

4. 研究成果

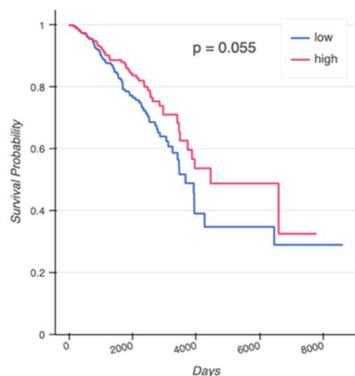
乳癌及び大腸癌検体の BIC database 解析により、乳癌及び大腸癌検体における細菌叢の門レベルの占有率を解析した(図1)。乳癌では Proteobacteria 門、Firmicutes 門、Actinobacteria 門の順に占有率が高かったが、大腸癌では Bacteroides 門、Firmicutes 門、Proteobacteria 門の順であった。一方、 α 多様性は乳がんでは平均 3.7798184294、大腸癌では 2.5774926251 であった。

(図1) 乳癌及び大腸癌検体における細菌叢の門レベルの占有率
乳癌 大腸癌

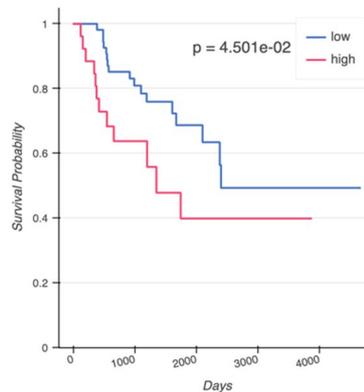


綱レベルの解析では、大腸癌と比較し、乳癌では Bacteroides 綱の相対的占有率が低下していた。属レベルの解析では、大腸癌と比較し、乳癌では、Fusobacterium 属の相対的占有率が低かったが、Allisonella 属、Megasphaera 属、Pediococcus 属、Abiotrophia 属、Granulicatella 属、Serratia 属、Enhydrobacter 属の占有率が高かった。リグナンの摂取と抗炎症作用及び抗腫瘍作用増強との関係性が示されている Bifidobacterium 属は、T 細胞受容体からのシグナルを正に増強する biological function を有すると考えられており、Bifidobacterium 属の高い相対的占有率は、良好な乳癌患者予後と相関する傾向(図2)があり、それと同時に免疫学的抗腫瘍効果を増強する細菌群とネットワークを形成することが判明した(図3)。一方で、悪玉菌として認識され、ミトコンドリア機能に影響を及ぼすと考えられる Prevotella 属は Actioplanes 属とネットワークを形成し、乳癌患者予後と逆相関していた(図4)。

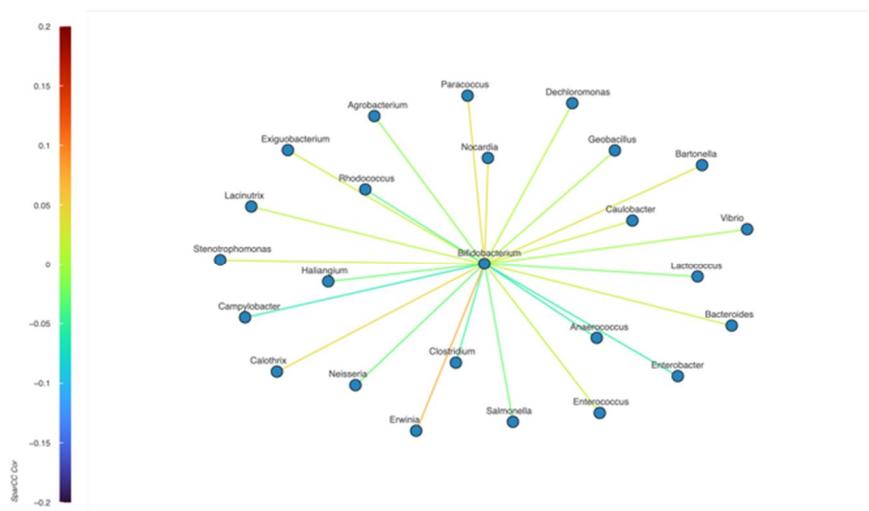
(図 2) Bifidobacterium 属と乳癌患者の全生存期間との相関



(図 4) Prevotella 属と乳癌患者の全生存期間との相関



(図 3) Bifidobacterium と他菌種とのネットワーク



(考察)

今回、我々の検討にて、乳癌患者に検出される細菌叢は大腸癌患者の細菌叢と異なり、特に Allisonella 属、Megasphaera 属、Pediococcus 属、Abiotrophia 属、Granulicatella 属、Serratia 属、Enhydrobacter 属の占有率が高いことが判明した。更に T 細胞応答を増強すると考えられる Bifidobacterium 属の相対的高占有率及び Prevotella 属の相対的低占有率と乳癌患者予後との相関が得られたこと及び各々の細菌属は他の細菌属とのネットワークを形成している事を考慮すると、適切な probiotics 投与などによって、特に ICI 等の治療効果の増強や cancer promotion の抑制等に影響を及ぼし、乳癌患者の予後改善に寄与できる可能性が示唆されたことは意義深いと考える。今回の解析ではエストロゲン代謝酵素に直接影響を及ぼすと考えられる細菌群と乳癌患者の予後や細胞シグナル経路との有意な相関は得られなかったが、閉経前後及び乳癌サブタイプ、分子分類や各種治療と細菌叢との相関関係を含めた更なる詳細な解析は意義深いものと考えられる。

(参考文献)

- 1 Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N. & Nunez, G. *Nat Immunol* **14**, 685-690, (2013).
- 2 Li, B., Selmi, C., Tang, R., Gershwin, M. E. & Ma, X. *Cell Mol Immunol* **15**, 595-609, (2018).
- 3 Tanoue, T. *et al. Nature* **565**, 600-605, (2019).
- 4 Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. *EMBO J* **11**, 3887-3895, (1992).
- 5 Topalian, S. L. *et al. N Engl J Med* **366**, 2443-2454, (2012).
- 6 Bijlsma, M. F., Sadanandam, A., Tan, P. & Vermeulen, L. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **14**, 333-342, (2017).
- 7 Le, D. T. *et al. Science* **357**, 409-413, (2017).
- 8 Thorsson, V. *et al. Immunity* **48**, 812-830 e814, (2018).
- 9 Chen, K. P., Hsu, C. L., Oyang, Y. J., Huang, H. C. & Juan, H. F. *Nucleic Acids*

Res 51, D1205-D1211, (2023).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ikeda Tetsuo, Okano Shinji, Hashimoto Naotaka, Kimura Koichi, Kudo Kensuke, Tsutsumi Ryosuke, Sasaki Shun, Kawasaki Junji, Miyashita Yu, Wada Hiroya	4. 巻 28
2. 論文標題 Histomorphological investigation of intrahepatic connective tissue for surgical anatomy based on modern computer imaging analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 76 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.753	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 Tetsuo Ikeda, Shinji Okano, Naotaka Hashimoto, Koichi Kimura, Kensuke Kudo, Ryosuke Tsutsumi, Shun Sasaki, Junji Kawasaki, Yu Miyashita, Hiroya Wada	4. 巻 17
2. 論文標題 Use of Insoluble Dietary Fiber and Probiotics for Bowel Preparation Before Colonoscopy: A Prospective Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Surg Laparosc Endosc Percutan Tech	6. 最初と最後の頁 0278995 ~ 0278995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLE.0000000000000995.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堤亮介, 橋本直隆, 岡野慎士, 和田寛也, 池田哲夫
2. 発表標題 排便促進効果のある不溶性食物繊維とプロバイオティクスによる大腸内視鏡前処置の有用性
3. 学会等名 日本消化器病学会九州支部例会
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
---------------------------	-----------------------	----

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