

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08552

研究課題名(和文) 肺癌の発癌・転移に関わる肺Microbiomeの同定と免疫療法との関連性の解明

研究課題名(英文) Identification of the respiratory microbiome associated with lung cancer by comprehensive genomic profiling

研究代表者

宮永 晃彦 (Miyanaga, Akihiko)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：00591281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：非小細胞肺癌における肺・気管支のmicrobiomeの意義を日本人の肺癌検体で検証し、新規診断マーカーへの応用を目指す。非小細胞肺癌手術検体50例の腫瘍・非腫瘍部組織において、次世代シーケンサーによる16sリボソームRNA遺伝子解析を行い、候補遺伝子を同定した。気道における特異的microbiomeとしてAcidovorax属に着目し、デジタルPCR法を用いて検証した。Acidovorax属は腫瘍組織に特に認められ、さらにCOPD合併非扁平上皮癌やTP53遺伝子変異陽性の腫瘍組織で有意であることを見出した($p < 0.05$)。Acidovorax属がCOPD合併肺癌に関与している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌は、近年分子標的薬やICIの登場により治療方法の進歩が著しいが、更なる治療成績の向上のためには、発癌機序の解明、早期診断が非常に重要である。そのため早期診断および治療標的となるバイオマーカーが求められている。これまで本邦では肺癌と肺microbiomeの関連性を検討した報告はなく、日本人肺癌コホートで、これらのmicrobiomeが発癌や癌の進展に関与しているかを検証することは、極めて重要である。肺microbiomeの発癌の機序の解明および制御により、発癌、癌の進展を抑制可能となれば、肺癌撲滅に寄与でき、社会的に高く求められている重要な研究課題と考える。

研究成果の概要(英文)：We aim to verify the significance of respiratory microbiomes in non-small cell lung cancer in Japanese patients and to apply them to novel diagnostic markers. We performed 16s ribosomal RNA gene analysis in tumor and non-tumor tissues of 50 non-small cell lung cancer surgical specimens by next-generation sequencing and identified candidate genes. Among the candidate microbiomes, we focused on Acidovorax and validated it using digital PCR. We found that Acidovorax was particularly present in lung cancer patients with COPD comorbidity and TP53 mutant ($p < 0.05$). Our results indicate that Acidovorax may be involved in COPD comorbidity lung cancer.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺癌 microbiome 遺伝子解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌は、近年分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) の登場により治療方法の進歩が著しいが、更なる治療成績の向上のためには、発癌機序の解明、早期診断が非常に重要である。そのため早期診断および治療標的となるバイオマーカーが求められている。

Microbiome は腫瘍組織の近傍に存在しており、周囲組織に浸潤する可能性があるため、発癌における重要なバイオマーカーとして近年注目されている。特定の細菌叢により、大腸癌のリスクが上昇することが報告されており、大腸癌と *Bacteroides fragilis* や *Fusobacterium nucleatum* などの関連が明らかにされている。特に大腸癌においては、炎症性腸疾患患者から一般的に単離された細菌叢である *F. nucleatum* が、大腸癌のリスク増加と関連していることが報告されている。呼吸器疾患においては、COPD や肺線維症は肺がんのリスク因子であり、これらの慢性炎症性疾患においても microbiome の関与が報告されている。

呼吸器疾患における microbiome についてはいくつかの知見が報告されているが、肺癌と関連のある肺・気管支の microbiome についてはこれまでほとんど知られていない。米国では、*TP53* 遺伝子変異を有する喫煙者における肺扁平上皮癌で *Acidovorax* や *Klebsiella* を含む 9 つの細菌叢が特異的に増加し、腫瘍組織内に *Acidovorax* が存在していることを報告している。この結果を踏まえ、日本人肺癌コホートで早期肺癌に関連のある microbiome を同定し、発癌や転移に関わる微小環境での役割を探索することは学術的に高い意味を持ち、臨床的にも有意義な研究であることから、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究は、本邦において肺癌の発癌や転移に関わる microbiome を同定し、それらの微生物叢の代謝産物が発癌や進行に影響を及ぼすメカニズムを解明することを目的とする。米国で初めて *TP53* 変異陽性の喫煙者の肺扁平上皮癌で特異的に発現している肺の microbiome が同定された。アジア人特に日本人肺癌患者コホートにおいて、早期肺癌に関連性がある肺 microbiome を同定すること、臨床背景と肺・気管支 microbiome の関連性を探索することにより、肺癌の発癌や転移・治療に関わる microbiome のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 日本医科大学付属病院において手術を受けた肺癌患者において、臨床情報や治療・予後を解析する。日本医科大学での clinical rebiopsy project に同意され保存されている肺癌組織検体および非腫瘍部組織の新鮮凍結組織 50 例から DNA を抽出し、次世代シーケンサー Pacific Biosciences Sequencing による Full length 16s リボソーム RNA 遺伝子解析を行い、候補遺伝子をバイオインフォマティクスにより絞り込みを行う。

(2) 候補となる特異的な microbiome について、デジタル PCR 法を用いて検出する特異的プライマーおよびプローブを作成し検証する。PCR プライマープローブセットを作成し、デジタル PCR (QX200 Droplet Digital PCR system) を用いて解析。

(3) 臨床情報との比較により、候補 microbiome と臨床背景や治療効果との関連性を検証する。

(4) 解析結果から新規のバイオマーカーを探索する。

4. 研究成果

(1) 非小細胞肺癌手術検体 50 例の腫瘍組織および非腫瘍部組織において、次世代シーケンサーによる 16s リボソーム RNA 遺伝子解析を行い、バイオインフォマティクスにより複数の候補遺

伝子を同定した (図 1)。

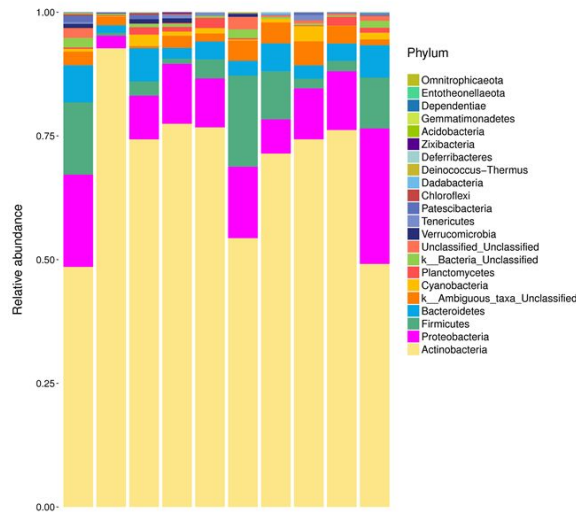


図 1. Pacific Biosciences Sequencing 解析

(2) 候補 microbiome の中から , 肺 ・ 気管支における特異的 microbiome として *Acidovorax* 属に着目し , 培養した *Acidovorax* から DNA を抽出して *Acidovorax* abundance を同定できる ddPCR assay を確立した (図 2)。

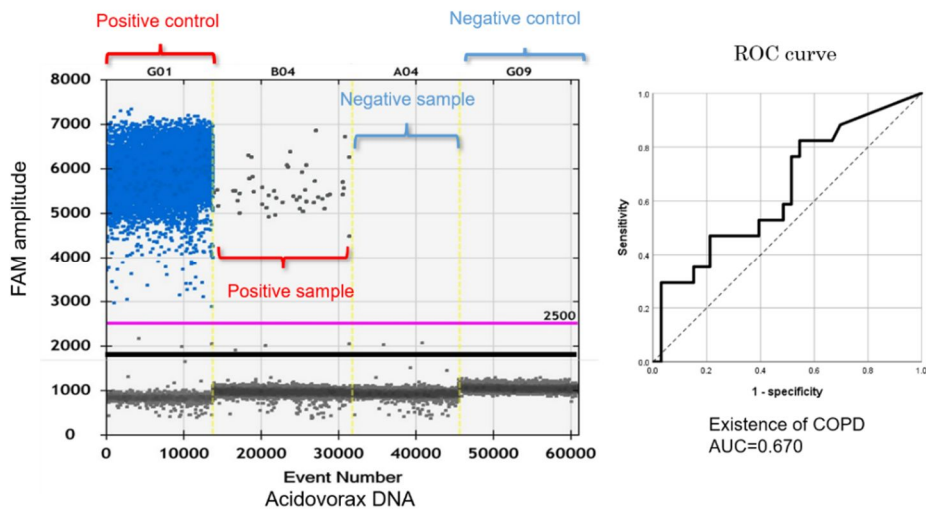


図 2. ddPCR 解析による *Acidovorax* の同定

(3) 腫瘍組織および非腫瘍部組織における *Acidovorax* の陽性率はそれぞれ 44% および 26% であった。腫瘍組織における *Acidovorax* の陽性率は、特に慢性閉塞性肺疾患 (COPD) を合併した非扁平上皮癌の患者および外科的切除後に再発した患者で有意に高かった ($p < 0.05$) (表 1)。単変量および多変量解析により、COPD のみが *Acidovorax* abundance に直接関与していることが明らかとなった ($p < 0.05$) (表 1)。さらに、*Acidovorax* abundance は、COPD の合併 (65%) および TP53 遺伝子変異を有する肺癌患者で高かった。COPD を合併した肺癌患者では、*Acidovorax* は腫瘍領域と正常組織の両方に存在する傾向があった。

Characteristic	Total	Acidovorax of tumor tissue		P value*
		Positive (%)	Negative (%)	
Gender				
Male	33	14 (42%)	19 (58%)	0.760
Female	17	8 (47%)	9 (53%)	
Age				
<65 yr	19	6 (32%)	13 (68%)	0.173
≥65 yr	31	16 (55%)	15 (45%)	
Smoking status				
Never smoked	16	6 (37%)	10 (63%)	0.535
Current or former smoker	34	16 (47%)	18 (53%)	
Histological subtype				
adenocarcinoma	35	16 (46%)	19 (54%)	0.041
squamous cell carcinoma	11	2 (18%)	9 (82%)	
others	4	4 (100%)	0 (0%)	
Pathological stage†				
I, II	30	13 (43%)	17 (57%)	0.910
III, IV	20	9 (45%)	11 (55%)	
COPD				
Absent	33	11 (33%)	22 (67%)	0.040
Present	17	11 (65%)	6 (35%)	
EGFR gene mutation/ ALK fusion gene				
Wild-type	34	16 (47%)	18 (53%)	0.535
Mutant	16	6 (38%)	10 (62%)	
Recurrence				
Absent	20	5 (25%)	15 (75%)	0.046
Present	26	14 (54%)	12 (46%)	
TP53 gene mutation				
Absent	41	14 (34%)	27 (66%)	0.022
Present	6	5 (83%)	1 (17%)	

Variable	n	Univariate analysis			Multivariate analysis		
		HR	95% CI	P value	HR	95% CI	P value
Gender							
Male/Female	33/17	0.82	0.256-9	0.755	0.40	0.091-1.787	0.232
Age							
< 65/ ≥65 yr	19/31	2.31	0.698-7.647	0.170	4.50	0.969-20.914	0.055
Histological subtype							
SCC/non-SCC	11/39	0.21	0.040-1.106	0.066	0.11	0.018-0.799	0.029
Pathological stage							
I, II/III, IV	30/20	1.07	0.342-3.342	0.907	1.83	0.463-7.297	0.387
COPD							
Absent/present	33/17	3.66	1.072-12.55	0.038	4.50	1.014-19.989	0.048
Gene mutation							
Absent/present	34/16	0.67	0.200-2.277	0.526	0.59	0.129-2.709	0.499

表 1. 患者情報と Acidovorax abundance

(4) COPD 合併肺癌患者は喫煙の関与が大きいことが知られているが、*Acidovorax* 属が COPD 合併肺癌の発癌や癌の進行に関与している可能性が示唆された。本研究結果は、*Acidovorax* が肺癌のスクリーニングにおいて有用なバイオマーカーである可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimizu M, Miyanaga A, Seike M	4. 巻 13
2. 論文標題 The respiratory microbiome associated with chronic obstructive pulmonary disease comorbidity in non-small cell lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thorac Cancer	6. 最初と最後の頁 1940, 1947
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1759-7714.14463.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水 理光, 宮永 晃彦 他
2. 発表標題 肺癌に関するマイクロバイオームの探索
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水 理光, 宮永 晃彦, 野呂 林太郎, 久保田 馨, 清家 正博, 弦間 昭彦
2. 発表標題 デジタルPCRによる肺癌に関するマイクロバイオームの探索
3. 学会等名 第61回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水 理光, 宮永 晃彦 他
2. 発表標題 COPD合併肺癌に関するマイクロバイオームの探求(Lung Microbiome Associated with COPD Comorbid Lung Cancer)
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮永 晃彦 他
2. 発表標題 網羅的遺伝子解析による肺癌関連の肺マイクロバイオームの検討
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
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
研究分担者	清家 正博 (Seike Masahiro) (30366687)	日本医科大学・医学部・教授 (32666)	
研究分担者	野呂 林太郎 (Noro Rintaro) (50366738)	日本医科大学・医学部・非常勤講師 (32666)	

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