

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15560

研究課題名（和文）遺伝子変異を標的とした膵癌関連Microbiomeと癌間質相互作用の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the interaction between the pancreatic cancer-related microbiome and host gene mutations to achieve precision medicine

研究代表者

阿部 俊也 (ABE, Toshiya)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20722028

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍内の "Fusobacterium nucleatum (F. nucleatum)" は、腫瘍細胞からのCXCL1の分泌を促進し、膵臓がんの進展を促進させることを示した。in vivo実験で "F. nucleatum" によってCXCL1-CXCR2軸が活性化され、免疫抑制性の腫瘍微小環境が形成されることをin vivo実験で明らかにした。今後はさらに詳細なメカニズムの解明を行い、膵腫瘍自体の遺伝子変異とMicrobiomeとの関連性についても検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回腫瘍内の "F. nucleatum" が腫瘍微小環境を改変し腫瘍成長を促進させることを示した。口腔細菌叢は部分的に膵臓内の微生物叢を表していると考えられ、膵腫瘍内の細菌が悪性腫瘍に影響を与えることを考慮すると、口腔細菌叢の解析が膵癌の新たな治療法の開発に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Intratumor "F. nucleatum" promotes CXCL1 secretion from cancer cells, contributing to cancer progression in an autocrine and paracrine manners. The CXCL1-CXCR2 axis is activated by "F. nucleatum" to create an immunosuppressive tumor microenvironment, and blockade of this axis suppresses tumor growth. Our results suggest a novel therapeutic approach for intratumor "F. nucleatum"-positive pancreatic cancer patients.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 Microbiome 遺伝子変異 個別化医療

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌の癌死亡率は本邦において第4位であり、年次推移でも増加傾向にある。その5年生存率は、9%(Siegel, *Cancer statistics*, 2020)といまだ大きな改善は見られない。我々の研究室では、膵癌の病理所見像として特徴的な desmoplasia と呼ばれる著明な間質の増生が、癌間質相互作用を通して膵癌の抗癌剤抵抗性に大きな影響を及ぼしていることを、これまで多数報告してきた。(Endo, Abe, *Gastroenterology*, 2017) (Abe, *Int J Oncol*, 2017)

一方で近年、*F.nucleatum* や *P.gingivalis*、*A.actinomycescomitans* などの口腔内常在菌が膵癌発症のリスクに関わること (Fan, *Gut*, 2018)や、これまで無菌の臓器と考えられてきた膵組織内、膵腫瘍内にも腸から移行した細菌叢が存在し、免疫寛容の誘導を介して膵癌の進展を促進していること (Pushalcar, *Cancer Discov*, 2018)が報告されている。特に膵腫瘍内は細菌量が多く、これらが化学療法抵抗性の原因となっていることが明らかになった (Geller, *Science*, 2017)。また、膵癌手術患者の術後の生存期間が腫瘍内の細菌叢と相関することが報告されていること (Riquelme, *Cell*, 2019)や、腫瘍内細菌は腫瘍細胞の核膜周囲に存在していることが報告されている (Nejeman, *Science*, 2020)。

これまでに膵癌の発癌に特定の腸内細菌や腫瘍内 Microbiome が関わっていることはすでに報告されているが、膵癌の治療抵抗性の原因の一つである desmoplasia と腫瘍内細菌との関連についてもこれまで報告されていない。また宿主の遺伝子変異と腸内細菌叢や腫瘍内 Microbiome が関連するといった報告はなく、膵癌の発癌過程において、特定の腸内細菌だけでなく、正常の膵臓や膵癌前駆病変、膵腫瘍内に存在する Microbiome がどのように発癌過程に関わっているかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍細胞内に存在する microbiome が腫瘍細胞の biology に影響を与えている可能性を考慮し、desmoplasia などの癌微小環境と Microbiome の関連に加えて、遺伝子変異と膵癌の発癌や遠隔転移に促進的・抑制的に関わる腸内細菌や腫瘍内の Microbiome との関連を明らかにすることである。

3. 研究の方法

腫瘍内および細胞内共生 microbiome の存在の確認

ヒト膵癌組織を用いて細菌の構成成分である lipopolysaccharide の存在を免疫染色により同定する。また、蛍光標識した細菌が膵癌細胞株に取り込まれることを Time Lapse imaging をもちいて撮影する。

膵癌細胞内共生 microbiome の同定

ステップ1で抽出されたDNAを用いて細菌特有の16S rRNA領域プライマーによるPCRで増幅させ、NGSによるメタゲノム解析を行い、膵癌細胞内共生 microbiome を同定する。しかし、実際には膵癌組織内共生 microbiome は同定できたが、細胞内共生 microbiome のみの抽出はできなかった。そこで、細胞内に侵入することが報告されている特定の細菌に着目して実験を進めることにした。中でも、無菌の臓器と考えられてきた膵組織内、膵腫瘍内に存在し、膵癌発症のリスクとなる口腔内細菌の一種 *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) を用いた。

In vitro における細胞内共生 microbiome が与える膵癌進展のメカニズム解明

ヒト膵癌細胞株と *F. nucleatum* を共培養し、腫瘍細胞の遊走能・浸潤能の解析を行う。癌細胞と *F. nucleatum* の共培養の上清のサイトカインアレイを行い腫瘍細胞の biology の変化を調べる。

近交系マウスを用いた感染腫瘍細胞による膵癌進展・転移の評価

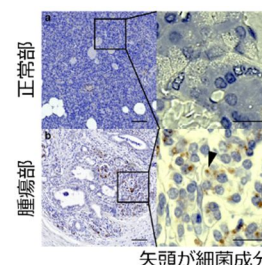
膵癌細胞株皮下移植マウスへ歯周病菌 *F. nucleatum* を腫瘍内投与し、腫瘍径を評価したところ、他の歯周病菌投与群と比較する。腫瘍をフローサイトメトリーと免疫染色により免疫細胞の変化を調べる。また、サイトカインアレイで得られた特定のサイトカインの変化を確認し、サイトカインの薬理的・遺伝学的な阻害により腫瘍成長に変化が認められるかを確認する。

4. 研究成果

腫瘍内および細胞内共生 microbiome の存在の確認

ヒト膵癌組織を用いて細菌の構成成分である LPS を抗 LPS 抗体による免疫組織化学染色検査で評価したところ、膵癌の約60例で腫瘍内細菌の存在を確認した(右図)。

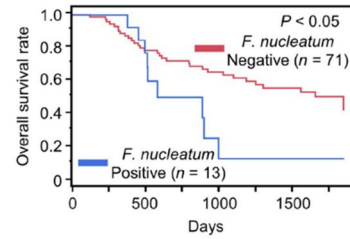
正常膵組織には LPS は検出されなかった。蛍光標識した細菌が膵癌細胞株に取り込まれることを Time-Lapse imaging でリアルタイム撮影することに成功した。



矢頭が細菌成分

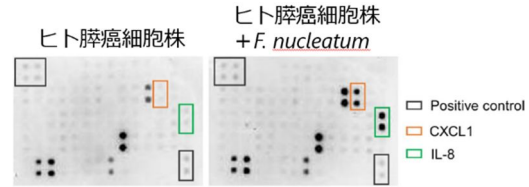
膵癌細胞内共生 microbiome の同定

細胞内に侵入することが報告されている特定の歯周病菌に着目し、ヒト膵癌組織の DNA 抽出産物を用いて、PCR で増幅させたところ、歯周病菌である *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) 由来の DNA 検出群は非検出群と比較して、治療前の腫瘍サイズが大きく、膵後方浸潤の割合が高く、overall survival rate が短いことが判明した (右図)。



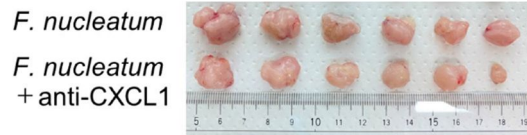
In vitro における細胞内共生 microbiome が与える膵癌進展のメカニズム解明

膵癌細胞株と *F. nucleatum* を共培養することで、膵癌細胞株の遊走能と浸潤能はともに増加した。これは、他の歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* では認められなかった。共培養の上清のサイトカインアレイを行い、CXCL1 が上昇していることが同定された (右図)。CXCL1 の受容体 CXCR2 に対する抗体を投与すると、遊走能・浸潤能は抑制された。



近交系マウスを用いた感染腫瘍細胞による膵癌進展・転移の評価

膵癌細胞株皮下移植マウスへ歯周病菌 *F. nucleatum* を腫瘍内投与し、腫瘍径を評価したところ、他の歯周病菌投与群と比較して、*F. nucleatum* 投与群では有意に腫瘍の増大が得られた。サイトカインアレイにより同定された CXCL1 の depletion 実験を行った。抗 CXCL1 抗体の投与、抗 CXCR2 抗体の投与のいずれにおいても腫瘍の増大が抑制されることにより確認できた (右図)。



CXCL1 の増加により骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) が増加し、それにより腫瘍浸潤性 T 細胞の減少がみられることが知られている。*F. nucleatum* を腫瘍内投与のモデルにおいても腫瘍内で MDSC の増加と腫瘍浸潤性 T 細胞の減少がみられることが免疫染色とフローサイトメトリーにより確認された。さらに、MDSC の働きを制限するためにその表面マーカーである Ly6G に対する抗 Ly6G 抗体によっても腫瘍の増大が抑制されることを確認した。

以上の結果より、細胞内で共生しうる *F. nucleatum* が膵癌微小環境の改変を通して膵癌の進行を促進していることを明らかにした。

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 Hayashi Masataka, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Luo Haizhen, Zhong PingShan, Date Satomi, Oyama Koki, Higashijima Nobuhiro, Kubo Akihiro, Iwamoto Chika, Torata Nobuhiro, Abe Toshiya, Yamada Yutaka, Ohuchida Kenoki, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 114
2. 論文標題 Intratumor Fusobacterium nucleatum promotes the progression of pancreatic cancer via the CXCL1 CXCR2 axis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3666 ~ 3678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15901	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masataka Hayashi, Naoki Ikenaga, Kohei Nakata, Haizhen Luo, PingShan Zhong, Koki Oyama, Nobuhiro Higashijima, Akihiro Kubo, Satomi Date, Chika Iwamoto, Kenoki Ohuchida, Masafumi
2. 発表標題 BIOLOGICAL EFFECTS OF INTRATUMOR PERIODONTAL PATHOGENS IN PANCREATIC CANCER
3. 学会等名 54th Annual American Pancreatic Association Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究協力者	林 昌孝 (HAYASHI Masataka)		

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