

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23918

研究課題名(和文) NGSを用いた膵発癌・転移に関わるMicrobiomeの解明とその治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of Microbiome which is related to pancreatic carcinogenesis, metastasis using NGS and application to the treatment

研究代表者

阿部 俊也 (ABE, Toshiya)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：20722028

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)：本研究では、膵癌の発症や転移に関わるMicrobiomeをNGSにより同定し、特定のMicrobiomeを標的とした膵癌治療法の開発を目的としている。

まず、ヒトおよびマウスの膵癌組織において抗LPS抗体を用いた免疫染色を行い、膵癌組織内のMicrobiomeが存在することを確認した。続いて、膵癌自然発生マウス由来の膵癌細胞株をマウスに同所移植し、腸内細菌叢の変化についてNGSによるメタゲノム解析を行なった。膵同所移植群では、プロバイオティクスとして注目されているAkkermansiaの糞便内での減少を認めた。Akkermansiaは膵癌抑制性に働くMicrobiomeの候補と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌が誘導する腸内細菌叢の変化が膵癌の進展に関わることや、膵癌により腸内細菌叢が変化するメカニズムを解明することができれば、ヒトの腸内細菌叢の解析により膵癌早期発見のスクリーニングや特定のMicrobiomeを標的とした新規治療法の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our purpose is to identify of microbiome about pancreatic carcinogenesis and metastasis using NGS and to develop of pancreatic cancer treatment targeting specific microbiome.

At first, we verified the existence of intratumor bacteria by immunohistochemistry using the anti-LPS antibody in the pancreatic cancer samples of human and mice. Next, to identify the change of gut microbiome, we performed meta genome analysis by NGS. In the orthotopic spontaneous pancreatic carcinogenesis model, we found the decrease of Akkermansia in gut microbiome. Akkermansia is known as probiotics, and is regarded as a candidate of pancreatic cancer restraint microbiome.

研究分野：医歯薬学

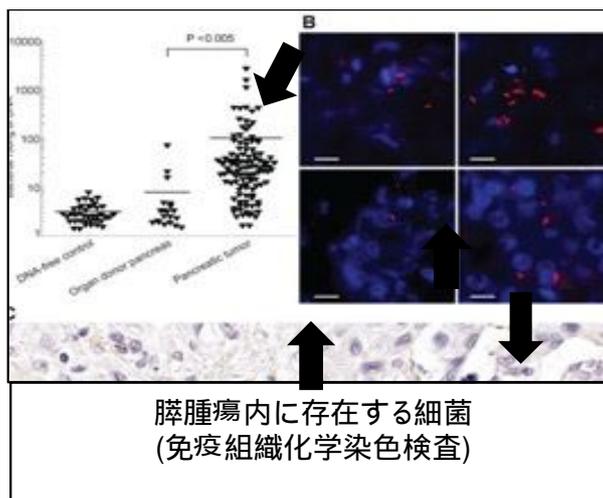
キーワード：膵癌 Microbiome オルガノイド 化学療法耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医学の進歩により癌の治療成績は飛躍的に向上したが、膵癌における5年生存率は、8%(Siegel, Cancer statistics, 2017)とまだまだ大きな改善は見られない。早期から浸潤、転移をきたす生物学的悪性度が高いこと、さらには放射線、化学療法にも抵抗性を示すことが、生存率に改善が見られない原因として考えられている。

一方で近年、特定の腸内細菌叢が免疫機能を抑制することで膵癌の進展を促進していること(Sethi, Gastroenterology, 2018)や、膵腫瘍内細菌叢が化学療法抵抗性の原因となっていること(Geller, Science, 2017)が報告されており(右図)、細菌叢に着目した新規治療法は膵癌の治療成績改善に繋がる可能性がある。



2. 研究の目的

本研究は、膵癌の発症や遠隔転移に関わるMicrobiomeを同定し、次世代シーケンサー(NGS)を用いて詳細に解析し、最終的には特定のMicrobiomeを標的とした治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒトや KPC マウスでの膵腫瘍内において Microbiome が存在することの確認

ヒトや膵癌自然発生マウス(KPC マウス)の切除膵癌組織を抗 LPS 抗体にて免疫組織化学染色を行い、膵腫瘍内の Microbiome の存在を確認する。

(2) 膵癌の進展に関わる Microbiome の候補の同定

KPC マウス由来の膵癌細胞株をマウスに同所移植し、得られた糞便の 16SrRNA 遺伝子を評価する。16SrRNA 領域プライマーにより PCR 増幅を行い、NGS によるメタゲノム解析で評価する。

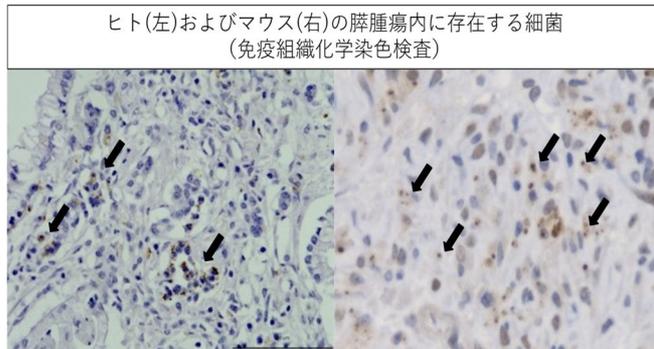
(3) In vitro における、Microbiome による化学療法耐性に関する検討

ヒトや KPC マウス切除組織からオルガノイドの樹立を行うと同時に、過去の報告(Geller, Science, 2017)に従い、切除組織より細菌培養を行う。培養によって得られた細菌を用いて Microbiome がオルガノイドに与える化学療法耐性の評価を in vitro において行う。切除組織より培養した細菌に抗癌剤(ゲムシタピン)を加えて培養したのち、フィルターを用いて細菌を除去し、その上清をオルガノイドに投与し、ゲムシタピン単独群、ゲムシタピン + 細菌培養群において、オルガノイドの増殖能などの評価を行う。

4. 研究成果

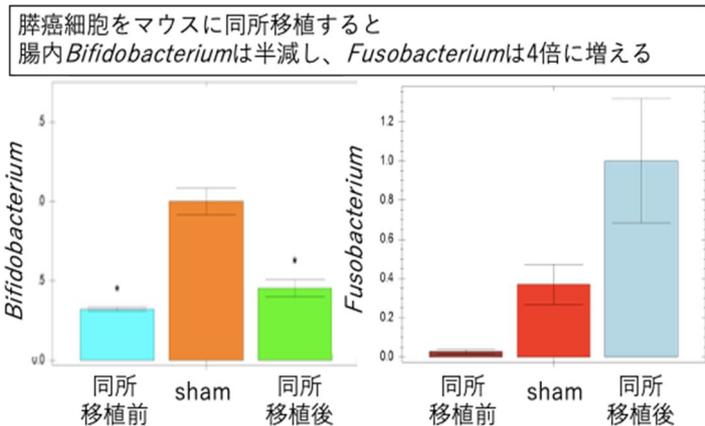
(1) ヒトやKPCマウスでの膵腫瘍内においてMicrobiomeが存在することの確認

膵腫瘍内Microbiomeの存在を検討するため、ヒト切除膵癌組織やマウスの膵癌組織を収集した。ヒトおよびマウスの膵癌組織から抗LPS抗体を用いた免疫組織化学染色検査を行い、膵腫瘍内Microbiomeが存在することを確認した(下図)。



(2) 膵癌の進展に関わるMicrobiomeの候補の同定

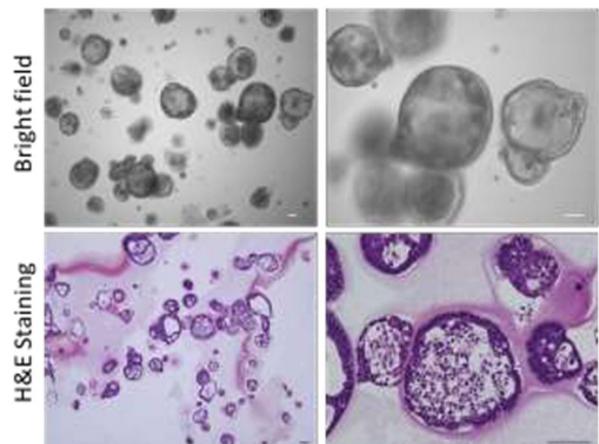
KPCマウス由来の膵癌細胞株をマウスに膵同所移植し、糞便中の16SrRNA遺伝子を評価した。その結果、膵腫瘍がプロバイオティクスである*Bifidobacterium*を半減させ、膵癌細胞の増殖を促進する*Fusobacterium*を4倍に増やしていることを見出した(下図)。また、腸内細菌叢の変化についてNGSによるメタゲノム解析したところ、膵癌同所移植群でプロバイオティクスとして注目されている*Akkermansia*の糞便内での減少を認めた。*Fusobacterium*は膵癌促進性、*Bifidobacterium*や*Akkermansia*は膵癌抑制性に働くMicrobiomeの候補である。今後はヒトやKPCマウス切除膵癌組織のMicrobiomeを対象にNGSを用いて詳細に解析し、腫瘍内・糞便中のMicrobiomeの相同性を評価していく。



(3) In vitro における、Microbiome による化学療法耐性に関する検討

我々の研究室では、既にヒト膵癌切除組織から実験に使用可能なオルガノイド株の樹立に成功している(右図)。ヒト組織から樹立したオルガノイドでの実験が思うように進まないことに備え、KPCマウス切除組織からオルガノイドを樹立しておく。ステップ(2)で得られた膵癌促進性・抑制性に働くMicrobiomeの候補を用いて、化学療法耐性に関する検討を行う。

ヒト膵癌切除組織より樹立した膵癌オルガノイド



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