

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21634

研究課題名（和文）膵癌が主導する腸内細菌叢の改変と膵癌肝転移成立のメカニズム解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of pancreatic cancer-induced dysbiosis and establishment of liver metastasis

研究代表者

小菌 真吾（KOZONO, Shingo）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：40706850

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌自然発生マウス由来の膵癌細胞株をマウスへ同所移植し、糞便の菌叢解析を行った。担癌マウスの腸内細菌叢はプロバイオティクスが減少し、癌の進展に影響を及ぼす細菌（細菌X）が増加していた。ヒトおよびマウスの腫瘍内には細菌の構成成分が存在しており、腫瘍内細菌叢が癌のbiologyに影響を与えている可能性がある。

担癌マウスの腸内細菌で同定した細菌Xと膵癌細胞株を直接共培養すると、特定のサイトカイン産生が促進され、癌の遊走能が亢進していた。In vivoにおいても膵癌細胞皮下注モデルに細菌Xを局注すると、癌の進展が促進され、膵癌が腸内細菌叢を改変し、癌の進展に影響を及ぼしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの癌研究における細菌叢の役割は“腸内細菌叢の変化が癌の進展を促進する”という一方通行の報告のみであり、“癌が主導して、自己の進展を促進する”との視点はなかった。膵癌が腸内細菌叢を改変し、自己の進展を促進させているという仮説に基づき、そのメカニズムを探る本研究は非常に特色のある研究である。細菌叢が膵癌微小環境に与える影響を評価するにあたり、当研究室で保有する膵癌自然発生マウスモデルを利用することで、より実生体に近い癌微小環境を再現した研究が可能であり、膵癌オルガノイドや膵癌自然発生マウスを基盤に細菌叢が癌微小環境に与える影響を評価するシステムを構築できれば、飛躍的な技術的革新となる。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic cancer cell lines derived from spontaneously developing mice were transplanted orthotopically into mice and analyzed for fecal microbiome. The microbiome of the carcinoma-bearing mice showed a decrease in probiotics and an increase in bacteria influencing cancer progression (bacteria X). Bacterial components were identified in human and mouse tumors, suggesting that the tumor microbiota influences cancer biology. Direct co-culture of pancreatic cancer cell lines with Bacteria X identified in the intestinal microbiota of carcinoma-bearing mice promoted specific cytokine production and enhanced the migrated potential of the cancer. These results suggest that pancreatic cancer alters the microbiota and influences the progression of cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 腸内細菌叢 膵癌肝転移

1. 研究開始当初の背景

膵癌の治療抵抗性の要因として、豊富な癌間質細胞(CAFs)とそれに付随する腫瘍免疫抑制性環境が挙げられる。当研究室では膵癌進展における癌間質相互作用の解明を基軸に特定の CAFs が癌の浸潤や治療抵抗性を強く増強し、癌間質相互作用の中心的役割を担っていることを報告した。また、CAFs のオートファジーを抑制することで CAFs の活性化を阻害でき、膵癌マウスの肝転移、腹膜播種が抑制される事を明らかにした。このように、膵癌は周囲微小環境を自己の進展に都合のいいように改変しており、多くの研究者が膵癌微小環境を標的とした新規治療法の開発を目指している。一方、膵癌の根治性が低い主な要因は“肝転移の形成”であるが、このプロセスには膵癌微小環境の改変を超えた全身的な要因があると考えられる。

腸内細菌叢はヒトの恒常性に多大な影響を与えるが、特に肝臓においては bacterial translocation を介した肝内微小環境の維持や免疫システムの構築に寄与しており、膵癌の肝転移成立においても何らかの役割を持つと考えられる。癌は自己の生存のため狡猾なまでに他の細胞を操るが、これと同様に腸内細菌叢も癌が自己の進展のためコントロールしているのではないかと着想した。

2. 研究の目的

膵癌においては、便移植による腸内細菌叢の改変で腫瘍内の免疫システムが変化し癌の進行に影響を及ぼすことが報告され、腸内細菌叢は膵癌治療のターゲットになる可能性がある。その一方で、腸内細菌叢の変化が免疫システムや癌の進展に影響を与えるとの報告は散見されるものの、癌自体が腸内細菌叢の形成にどのような役割を持つかを解明した報告はまだない。

本研究では、膵癌の持つ“腫瘍促進性微小環境構築”に注目し、膵癌が固有の腸内細菌叢形成に果たすメカニズムを解明する。膵癌のもたらすケミカルメディエーター分泌や膵内外分泌機能変化が腸内細菌叢に及ぼす影響を解析し、膵癌が自己の進展のため腸内細菌叢の改変に積極的に関与しているかどうかを明らかにする。特に、膵癌の根治性を低下させる肝転移の成立の機序に注目し、腸内細菌叢が膵癌の肝転移成立に果たす役割も解析する。

3. 研究の方法

まず、遺伝子改変膵癌自然発生マウス(KPC マウス)より樹立した膵癌細胞株を膵同所移植し、腸内細菌叢の変化を NGS によるメタゲノム解析を行う。KPC マウスモデルに膵癌細胞同所移植を行うデザインで腸内細菌叢に変化の見られた組織を用いて、膵局所、肝臓での分子生物学的変化を RT-PCR、免疫組織化学染色検査で解析する。免疫細胞浸潤の変化についてはフローサイトメトリーで解析する。腸内細菌叢変化の原因となる候補分子を同定し抑制実験で validation を行う。

続いて、脾注によるマウス膵癌肝転移モデルを使い、腸内細菌叢と肝内細菌叢、転移巣周囲の微小環境解析を行い、膵癌による腸内細菌叢変化が肝転移形成に及ぼす影響について解析する。得られた結果はヒト膵切除組織、ヒト膵がん肝転移組織で validation を行う。

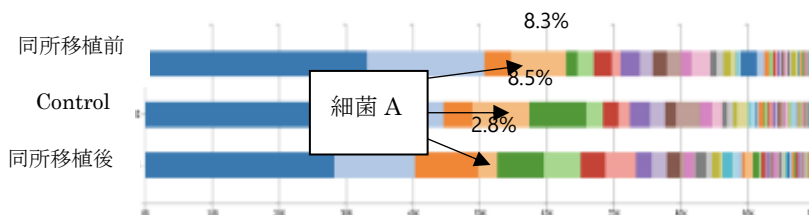
4. 研究成果

(1) 膵癌は腸内細菌叢のバランス異常を惹起する

膵癌自然発生マウス由来の膵癌細胞株を、マウスへ同所移植し、糞便の菌叢解析を行った。Control と比較して、膵癌マウスでは、同所移植前と比較して菌叢の構成が変化しており、腸内細菌叢のバランス異常を来していることが示唆された。

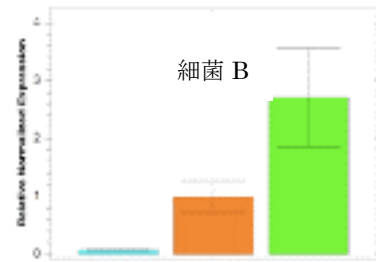
(2) 担癌マウスではプロバイオティクスが減少し、癌の進展に影響を与える菌が増加する

アンプリコンシーケンス解析では、膵癌細胞同所移植マウスではプロバイオティクスである細菌 A が減少していた。また PCR では癌の進展に影響を与えるとされる細菌 B が増加していた。



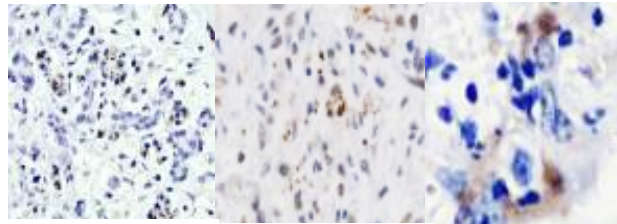
(上図) マウス腸内細菌のアンプリコンシーケンス解析結果

(右図) マウスの腸内細菌の細菌 B の PCR 増幅結果
 左から同所移植前、Control、同所移植後
 同所移植により細菌 B は Control と比較して
 2.5 倍増加



(3) ヒトおよびマウスの腓腫瘍内および肝転移巣に細菌が存在する

腸内細菌が腓腫瘍内に到達することで、癌の biology に影響を与えている可能性を評価するために、腓腫瘍内および肝転移巣の細菌の存在を、グラム陰性菌の構成成分である LPS 抗体を用いて免疫組織化学染色検査を行った。ヒトの腓腫瘍内やマウスの腓腫瘍内や肝転移巣内に LPS が染色されていた。LPS は正常腓組織や肝組織では染色されておらず、腫瘍内の細菌が癌の biology に影響を与えていることを示唆する結果であった。



(右図) ヒトおよびマウス腫瘍組織中の
 LPS 免疫組織化学染色検査

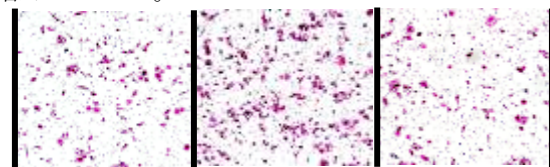
ヒト腓腫瘍組織 マウス腓腫瘍組織 マウス肝転移

(4) マウスの糞便移植による肝臓の免疫細胞の変化

担癌マウスの糞便が癌の進展に与える影響を評価するために、ステップ(1)および(2)で菌叢解析を行ったマウスの腸内細菌を別のマウスへ経口で糞便移植を行い、肝臓の免疫細胞の変化を評価した。糞便移植を行うことで、移植した糞便と同様の細菌 B の増加を認めたが、フローサイトメトリーで肝臓における明らかな免疫細胞の変化は認められなかった。担癌状態でないマウスに糞便移植を行ったため、肝臓における免疫細胞の有意な変化が認められなかった可能性がある。

(5) 担癌マウスの腸内で増加した菌は癌の進展を促進する

糞便移植では免疫細胞の変化や癌の進展は評価できなかったため、担癌マウスで増加した細菌 B に着目した実験を行った。細菌 B とヒト由来腓癌細胞株を直接共培養すると、Control や他の細菌 C と比較して、癌細胞の遊走能が有意に増加していた。



(右図) ヒト由来腓癌細胞株と細菌の直接共培養による migration assay。

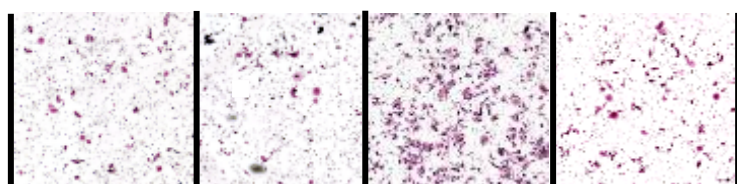
Control 癌細胞+細菌 B 癌細胞+細菌 C

(6) 細菌 B は癌細胞を刺激してサイトカインを産生し、癌の進展を促進する

細菌が癌細胞を刺激して分泌するサイトカインが癌の進展に影響を与えている可能性を考慮して、120 種類のサイトカインをターゲットとした array を行ったところ、CXCL1 や IL-8 といったサイトカインが細菌 B と癌細胞の直接共培養により増加していることが明らかとなった。

CXCL1 や IL-8 のレセプターである CXCR2 は癌細胞表面に発現しており、CXCR2 の中和抗体を用いると、癌細胞の遊走能が強く抑制されたことから、細菌 B は癌細胞を刺激して CXCL1 や IL-8 を産生し、癌の進展に影響を与えることを示唆する結果であった。

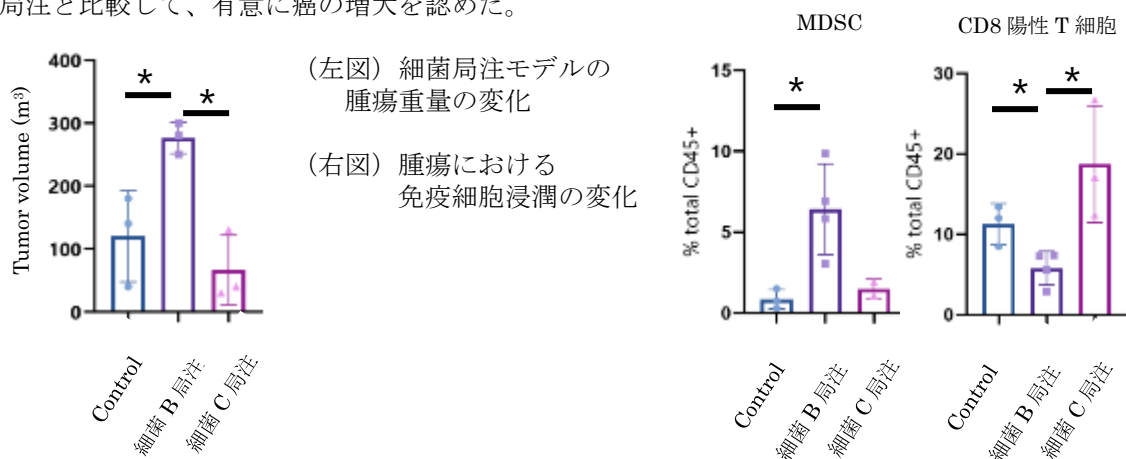
(右図) CXCR2 中和抗体を用いた細菌とヒト由来腓癌細胞株との直接共培養による migration assay 結果。



Control 癌細胞+ 癌細胞+細菌 B 癌細胞+細菌 B+
 CXCR2 中和抗体 CXCR2 中和抗体

(7) 細菌 B は膀胱癌皮下注マウスモデルにおいて癌の進展を促進する

細菌 B を KPC マウス由来膀胱癌細胞株の皮下注モデルに局所注射する実験を行い、in vivo における細菌 B が癌の進展に与える影響を評価した。細菌 B の局注モデルでは Control や細菌 C の局注と比較して、有意に癌の増大を認めた。



また腫瘍の免疫細胞浸潤の変化をフローサイトメトリーで評価したところ、骨髄由来免疫抑制性細胞が増加し、CD8 陽性 T 細胞が減少していた。以上の結果から、細菌 B は癌細胞の遊走能を直接亢進し、また免疫抑制性細胞を増加させることで、CD8 陽性 T 細胞が減少し、間接的に癌の進展に影響を与えていることを示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 目井孝典, 大西秀哉, 佐藤優, 岩本直也, 益田昌吾, 長尾晋次郎, 古賀智子, 中村雅史
2. 発表標題 歯周病病原菌を用いた腸管ディスバイオシスによる移植免疫メカニズムの解明
3. 学会等名 第34回日本バイオセラピー学会学術集会総会
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	進藤 幸治 (SHINDO Koji) (00788432)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	大内田 研宙 (OHUCHIDA Kenoki) (20452708)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	久保 真 (KUBO Makoto) (60403961)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	安井 隆晴 (YASUI Takaharu) (60611283)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	

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