

令和 6 年 4 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14762

研究課題名（和文）腸内・口腔内・腫瘍内細菌が膵がんの病態に及ぼす影響の解明と新規膵がん治療法の開発

研究課題名（英文）Developing a novel therapeutic strategy for pancreatic cancer utilizing gut microbial metabolites

研究代表者

山村 凌大（Yamamura, Ryodai）

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：40880000

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）：本研究で申請者はまず、北海道大学病院にて膵がん患者ならびに健常対照者を対象とした臨床研究を実施し、68名から糞便・唾液検体を採取した。結果として我々は膵がん患者に特徴的な腸内細菌属を3属同定することに成功し、さらにメタボローム解析の結果これらの細菌が産生する代謝産物が膵がん患者の糞便中で顕著に減少していることを確認した。さらに我々は本研究で、自身らで作出した、膵がん患者の中でも最も予後不良の患者群の遺伝子型である4遺伝子変異を模倣したショウジョウバエを活用し、上述の臨床研究で同定した細菌代謝産物が既存の抗がん剤の抗腫瘍形質効果を顕著に増強することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で申請者らは、臨床検体を活用したマルチオミクス解析を実施し、膵がんの発症および病期進行に影響を及ぼす細菌属および代謝産物を同定することに成功した。また本研究では多大な研究資源を要する哺乳類実験の前段階にハエを活用することで、細菌叢やその代謝産物が膵がんの病態に及ぼす影響とその機序を解明することができた。加えて申請者らは、これらの成果に立脚した膵がんの新規治療法候補の創出にも成功し、今後この治療法候補の社会実装に取り組む。

研究成果の概要（英文）：In this study, we first conducted a clinical study of pancreatic cancer patients and healthy controls at Hokkaido University Hospital, and collected fecal and saliva samples from 68 patients. As a result, we succeeded in identifying three genera of the gut bacteria characteristic of pancreatic cancer patients, and further confirmed that the metabolites produced by these bacteria were significantly decreased in the feces of pancreatic cancer patients. Furthermore, we utilized a Drosophila model mimicking the genetic signature in pancreatic cancer and found that the bacterial metabolites identified in the clinical studies described above markedly enhance the antitumor trait effects of existing anticancer drugs.

研究分野：腫瘍微生物学

キーワード：腸内細菌 口腔内細菌 腫瘍内細菌 膵がん 代謝産物 新規治療法

1. 研究開始当初の背景

膵がんは、有効な治療法が存在しない代表的な難治がんで、今後も罹患者数・死亡者数ともに増加し続けることが確実視されている (Mizrahi et al. *Lancet* 2020)。このことから厚生労働省は、膵がんの治療成績向上が喫緊の福祉課題であると宣言している (がん対策推進基本計画、がん研究10か年戦略)。

この解決のためにも、膵がんの本態解明と新規治療法の開発が必要だが、最近膵がん患者では健常人と比較して腸内細菌の一種 *Bacteroides* 属が多いことなどが示された (Half et al. *Ann Oncol* 2015)。また、膵がん患者では健常人と比較して、口腔内細菌のうち *Porphyromonas* 属が多いこと、そして腫瘍内にも細菌叢が存在し (腫瘍内細菌叢)、膵がんの短期生存者は長期生存者と比較して腫瘍内の *Saccharopolyspora* 属が少ないことも明らかとなった (Fan et al. *Gut* 2016; Riquelme et al. *Cell* 2019)。しかし、これらの細菌叢の変動が膵がんの発症・進展・治療応答性に及ぼす影響やその詳細な機序については、未だ不明である。

以上の状況から、「どの腸内・口腔内・腫瘍内細菌種が、どのように膵がんの発症、進展や治療応答性に影響を及ぼすか」という極めて重要な学術的「問い」が未解決のまま残されている。これを解決するためには臨床研究と動物実験の両方が必要だが、申請者らは両研究分野において豊富な研究実績を有しており、これまでに大規模ヒト集団を対象とした菌叢解析、ならびにマウスやショウジョウバエを用いたがんの発生・悪性化機序の解明や新規治療薬の開発に成功している (Yamamura et al. *Biosci Microbiota Food Health* 2020; Sonoshita et al. *Cancer Cell* 2011; Sonoshita et al. *Nat Chem Biol* 2018; Ung*, Sonoshita* et al. *PLoS Comput Biol* 2019 [*equal contribution] など)。上述の問いの解決に向けこれらの独自の研究基盤を融合して、膵がんの本態を解明するとともに、効果的な治療法の開発が長年極めて難航している膵がんの新規治療標的を同定し、学術振興と膵がん患者救済の双方を加速できると期待される。

2. 研究の目的

本研究は、膵がん患者を対象とした臨床研究で膵がんの進展や治療応答性と関連する腸内・口腔内・腫瘍内細菌種を同定し、それらが膵がんの発生や進展に影響を及ぼす分子機序を、複数の動物モデルを相補的に活用して解明することを目指す。さらに、この成果に立脚し、細菌叢改変と抗がん剤を組み合わせた膵がんの新規治療戦略の創出を目指す。

3. 研究の方法

① 膵がん患者に特徴的な腸内・口腔内細菌の同定と、膵がん死と関連する腸内・口腔内・腫瘍内細菌の同定

本項目では、ヒト症例対照研究を実施する。症例群は、北海道大学病院の新規膵がん患者のうち、膵がんの切除可能な20名 (以下 Resectable [R] 群)、および切除不能な20名 (以下 Unresectable [UR] 群) の計40名とする。対照群は、同病院整形外科に通院中の患者で、消化器疾患の既往歴がなく症例群と性・年代が合致する40名とする。

糞便検体と唾液検体は、採取キットを使用して被験者自身が採取する。また R 群については、糞便・唾液検体に加えて、膵がん検体を切除術中に執刀医が採取し、直ちに -80°C で冷凍保管する。そして、各検体の細菌 16S rRNA 領域を次世代シーケンサーと菌叢解析ツール QIIME2 を用いて解析し、検体内に棲息する細菌種を網羅的に同定する。次に、同定した腸内・口腔内細菌叢を対照・R・UR の3群間で網羅的に比較し、対照と比較して R・UR 群で減少している腸内・口腔内細菌種を上位2種ずつ、計8種同定する。

R・UR 群についてはさらに、初回治療終了後1年間追跡調査し、奏功群 (生存) と非奏功群 (死亡) に分類する。1年間は、膵がんの生存期間中央値が約8ヶ月であることを鑑み、追跡終了時点で奏功・非奏功群の対象者数に大きな差がなく、統計学的検定の頑健性を保てる期間として設定した。次に、Cox 比例ハザード解析にて、R 群および UR 群の死亡抑制と最も強く関連する腸内・口腔内細菌種をそれぞれ2種ずつ、合計8種同定する。また R 群については、死亡抑制と最も強く関連する腫瘍内細菌種も上位2種を同定する。

② 腸内・口腔内・腫瘍内細菌が膵がんの発症・進展・治療応答性に影響を及ぼす機序解明と新規治療法開発

本項目ではまず、細菌叢改変と既存の抗がん剤を組み合わせた膵がんの新規治療法を開発する。まず、上述の臨床研究で同定した細菌を各々対照ハエおよび膵がん遺伝子型モデルハエ (以下、4-hit ハエ) に経口投与し、上記指標に基づき腫瘍形質を最も強く抑制する細菌上位3種を迅速に同定する。次に、同定した3種それぞれ単独ならびに全ての組み合わせと、膵がん治療に認可されている5種類の化学療法 (FOLFIRINOX、ゲムシタピン、ゲムシタピン+ナブパクリタキセル併用療法、ゲムシタピン+エルロチニブ併用療法、テガフルル・ギメラシル・オテラシルカリウム配合剤) のそれぞれを組み合わせ、4-hit ハエに経口

投与し、腫瘍細胞の発生・増殖や致死表現型を最も強く抑制する細菌種と化学療法の組み合わせ上位3種を同定する。最後に、これら3種を前段のモデルマウスに投与し、原発巣体積や遠隔転移の有無、マウス生存率の経時変化を指標に、各々の単独処置と比較して抗腫瘍効果が最も高い組み合わせを腫瘍新規治療法として同定する。さらに、腫瘍や大腸、肝臓、脳、血液、尿などの主要臓器において RNA-seq やリン酸化タンパクアレイ、メタボローム解析を実施し、その結果を *in silico* ネットワーク解析することで、短鎖脂肪酸が影響を与えるシグナル経路や代謝産物を網羅的に同定する。以上により、「どの細菌種がどのようにがんの形質を抑制するのか」という問いに答える。以上の解析により、機序とマーカーの裏付けを有する新規腫瘍治療法を創出する。

4. 研究成果

申請者らは最近、ハエを活用し、腫瘍患者の様々な遺伝子型を模倣した世界初のモデル動物ライブラリを構築した。そして、特に4遺伝子（がん遺伝子 *KRAS* の活性化、がん抑制遺伝子群 *TP53*・*CDKN2A*・*SMAD4* の不活性化）の変異を模倣した *4-hit* ハエが最も悪性の形質を呈することを発見した。この結果は、この遺伝子型を有する患者が最も予後不良であるとの臨床報告（Qian et al. *JAMA Oncol* 2023）と矛盾しない。これを踏まえて申請者らは、この *4-hit* ハエの遺伝学スクリーニングと、自身らが有する哺乳類解析基盤（Sonoshita et al. *Nat Med* 2001、Sonoshita et al. *Cancer Res* 2002、Sonoshita et al. *Cancer Cell* 2011、Sonoshita et al. *Cancer Discov* 2015、特許 6537143 など）を相補的に活用し、ヒト腫瘍ゼノグラフトの成長を著明に抑制する、AURORA キナーゼ B と MEK の共阻害シーク（国際特願 PCT/JP2021/007651; Sekiya, Yamamura et al. *Cancer Res* 2023）を見出すことに成功した。また、リボフラビンの代謝経路を標的とするシーク（米国特許 US Patent 11,925,646）や GSK3b 阻害シーク（Fukuda, Yamamura et al. *Cancer Sci* 2024）も創出した。さらに申請者らは、ハエと哺乳類、計算化学、創薬化学の異分野融合を展開し、副作用を招来する標的に結合しないよう認可薬の化学構造を改変して副作用を大幅に低減する新規の論理的創薬手法 Rational Polypharmacology を開発し、甲状腺がんの治療薬リードを創出することにも成功している [Sonoshita et al. *Nat Chem Biol* 2018; Ung[#], Sonoshita[#] et al. *PLoS Comput Biol* 2019 ([#]equal contribution); 米国特許 US Patent 10,519,113]。このように申請者らは、複数のモデルや技術の連動研究基盤を活用し、新規シークの開発を積極的に推進している。

これらの独自の研究基盤に立脚し申請者らは、腸内細菌由来物質を活用した腫瘍治療法の創出を目的に以下の研究を実施した。申請者はまず、腫瘍の発症および進展と関連する腸内細菌種を同定することを目的に北海道大学病院にて臨床研究を実施し、治療介入前の腫瘍患者 28 名と、腫瘍患者と性・年代・人種をマッチングさせた健常対照者 40 名の腸内細菌叢の組成を網羅的に比較した。その結果申請者は、腫瘍患者に特徴的な腸内細菌属を 3 属同定することに成功し、さらにメタボローム解析の結果これらの細菌が産生する代謝産物が腫瘍患者の糞便中で顕著に減少していることを確認した。さらに我々は本研究で、*4-hit* ハエを活用し、臨床研究で同定した細菌代謝産物が既存の抗がん剤の抗腫瘍形質効果を顕著に増強することを発見した。加えて申請者は哺乳類モデルを用いた解析で、この細菌代謝産物と既存の抗がん剤の組み合わせがヒト腫瘍細胞ゼノグラフトの成長を顕著に抑制することも確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamamura Ryodai, Ooshio Takako, Sonoshita Masahiro	4. 巻 112
2. 論文標題 Tiny Drosophila makes giant strides in cancer research	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 505 ~ 514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14747	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 -
1. 著者名 Sekiya Sho, Fukuda Junki, Yamamura Ryodai, Ooshio Takako, Satoh Yusuke, Kosuge Shinya, Sato Reo, Hatanaka Kanako C., Hatanaka Yutaka, Mitsuhashi Tomoko, Nakamura Toru, Matsuno Yoshihiro, Hirano Satoshi, Sonoshita Masahiro	4. 巻 83
2. 論文標題 Drosophila Screening Identifies Dual Inhibition of MEK and AURKB as an Effective Therapy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2704 ~ 2715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.can-22-3762	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 -
1. 著者名 Fukuda Junki, Kosuge Shinya, Satoh Yusuke, Sekiya Sho, Yamamura Ryodai, Ooshio Takako, Hirata Taiga, Sato Reo, Hatanaka Kanako C., Mitsuhashi Tomoko, Nakamura Toru, Matsuno Yoshihiro, Hatanaka Yutaka, Hirano Satoshi, Sonoshita Masahiro	4. 巻 115
2. 論文標題 Concurrent targeting of GSK3 and MEK as a therapeutic strategy to treat pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1333 ~ 1345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.16100	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 -
1. 著者名 Yamamura Ryodai, Inoue Kumi Y., Nishino Kunihiko, Yamasaki Seiji	4. 巻 2
2. 論文標題 Intestinal and fecal pH in human health	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiomes	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/frmbi.2023.1192316	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 -

1. 著者名 Jiang Hui、Kimura Taku、Hai Han、Yamamura Ryodai、Sonoshita Masahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Drosophila as a toolkit to tackle cancer and its metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2022.982751	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 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山村 凌大
2. 発表標題 ショウジョウバエを活用した膵がん発生過程におけるマイクロバイオームの役割の解明と創薬への展開
3. 学会等名 第12回 Top Runners in TRS (招待講演)
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

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