

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16796

研究課題名（和文）子宮頸癌FFPE組織を用いた16s rRNAマイクロバイオーーム解析

研究課題名（英文）16s rRNA microbiota in cervical cancer

研究代表者

小林 彩（Kobayashi, Aya）

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：50596971

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：当院倫理委員会の承認のもと、14例の子宮頸癌のFFPE組織検体での検討を行った。抽出腫瘍DNAを用いた16s rRNAマイクロバイオーーム解析を行ったところ、14例全ての組織内細菌叢を構成する細菌種の同定および構成比率を解析することは可能であった。しかしながら、本研究では一般臨床使用を目指していたためFFPE組織検体を使用したため、その場合コントロールとして組織のないパラフィン部分を解析し、その結果の細菌叢を引くことにより有意な細菌を同定できるが、安定した結果が出なかった。これは症例ごとの同封される細菌の違いや、無菌操作ではないことが原因として考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を遂行することにより、今まで確立されていなかった、子宮頸癌の進行や治療抵抗性メカニズムと組織内の細菌層との関連についての見解が得られる可能性があり、臨床背景のみならず、腫瘍の遺伝子変異や微小環境も含めた包括的検討を行う点についても新規性がある。さらに子宮頸癌の放射線治療症例について検討することにより、口腔癌・喉頭癌・食道癌・大腸癌などの細菌叢解析が可能な癌についても応用できる可能性を秘めており、今後の癌治療において意義深い知見が得ることができると考えられ、本研究を開始した。

研究成果の概要（英文）：With the approval of our hospital's ethics committee, we conducted a study on FFPE tissue samples from 14 cases of cervical cancer. 16s rRNA microbiome analysis using extracted tumor DNA was performed, and it was possible to identify and analyze the composition ratio of the bacterial species that make up the tissue flora of all 14 cases. However, since this study was aimed at general clinical use, FFPE tissue samples were used. In this case, the paraffin part without tissue was analyzed as a control, and although significant bacteria could be identified by subtracting the resulting bacterial flora, stable results were not obtained. This was thought to be due to differences in the bacteria enclosed with each case and the lack of aseptic processing.

研究分野：産婦人科学関連

キーワード：子宮頸癌 マイクロバイオーーム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦における子宮頸癌による死亡数は年間に約 3000 例と言われており、近年では妊娠・出産を控えた 20～30 歳代の若年層の罹患率が急増し、若年女性の癌による死亡率でも子宮頸癌が一番多くなっている。臨床進行期や組織型を考慮して手術療法、化学療法、放射線療法などの集学的治療が選択され、近年初期癌の治療成績は向上しているが、特殊な組織型や進行・再発症例における個々の腫瘍反応性は異なり、治療効果も様々である。近年の癌研究において、肺癌や大腸癌などの悪性腫瘍では患者個々の癌の遺伝子プロファイルに合わせた Precision medicine 研究が進められ、多種の分子標的薬が臨床導入されているのに対し、子宮頸癌では bevacizumab (抗 VEGF 抗体) およびマイクロサテライト不安定性 (MSI) 陽性症例に対する pembrolizumab (抗 PD-1 抗体) が承認されているのみである。しかし、子宮頸癌における MSI 陽性率は高くなく、pembrolizumab を使用できる症例はかなり限定される。同時放射線化学療法 (Chemoradiotherapy; CCRT) の導入により生存率が改善したものの、放射線治療抵抗性であり予後不良な組織型である腺癌が若年層で増えていることもあり、予後改善のためには新規治療戦略の確立が必要である。

近年、申請者らは、婦人科癌における新規治療戦略の標的探索および腫瘍特性のモニタリングツールとして、最新の技術である超高感度次世代シーケンサー法による血液リキッドバイオプシー検体を用いた網羅的遺伝子変異解析に関する研究を継続して行ってきた (Noguchi et al, Onco Lett, 2020 / Iwahashi et al., Sci Rep, 2019 / Iwahashi et al., Oncol Lett, 2018)。子宮頸癌についても血液リキッドバイオプシーによる遺伝子プロファイリング研究を開始し、子宮頸癌患者 38 例のうちの 33 例 (87%) で何かしらの遺伝子異常を、過去の複数の報告と同様に 13 例 (34%) で PIK3CA の pathogenic な変異を認め、EGFR・MET・ERBB2 の増幅を認める症例も検出できた。さらに CCRT 治療症例において、治療前後の血液検体を解析比較することで、腫瘍特性モニタリングが可能であった。このように、子宮頸癌においてもリアルタイムな患者個々の癌クローンの特性解析の実用性について検討することができ、将来的に新たな分子標的薬が開発された際に、治療対象となる分子のリアルタイムな検出法の一つとしてのリキッドバイオプシーの可能性について示した。

そこで申請者は、これまでの子宮頸癌の遺伝子プロファイリング研究を継続しながら、さらに子宮頸癌の増殖や転移、放射線感受性や治療抵抗性メカニズムの解明を進めるために、新たな切り口として 16s rRNA を用いた“マイクロバイーム (細菌叢)”に着目した新規性のある研究を計画した。近年、侵襲がなく採取できる糞便などを用いた腸内細菌叢解析が様々な疾患で注目されており、特定の腸内細菌およびその代謝物が炎症を引き起こし、炎症性疾患や大腸癌・肝臓癌などの悪性腫瘍の原因となると報告されている。しかしながら、排泄物である便内の細菌叢は日内変動があり、患者の体調にも大きく左右されるため、結果が安定しないという問題点があった。そこで、一部の研究施設では主に大腸癌において、腫瘍生検組織のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片から DNA を抽出し、腫瘍組織 16s rRNA の細菌叢解析を行う試みが始められている。子宮頸癌において、海外から腔分泌物の細菌叢解析の報告があるが、便に比べ外界に接しているため不安定な上、十分な DNA 量を採取することが困難であり、解析不能な症例が多いことが問題に挙げられる。そこで、本研究では安定で解析に十分な DNA を抽出可能である腫瘍生検組織の FFPE 切片を用い、子宮頸癌 FFPE 組織由来 DNA に対するマイクロバイーム解析を計画した。

子宮頸癌研究において、国外において腔分泌物を用いた細菌叢解析の報告はあるものの、検出感度が十分ではなく解析不能な症例が多い点が問題であった。本研究のような FFPE 腫瘍組織からの抽出 DNA および次世代シーケンサーを用いた 16s rRNA マイクロバイーム解析研究の報告は国内外を通してまだない。本研究を遂行することにより、今まで確立されていなかった、子宮頸癌の進行や治療抵抗性メカニズムと組織内の細菌層との関連についての見解が得られる可能性があり、臨床背景のみならず、腫瘍の遺伝子変異や微小環境も含めた包括的検討を行う点についても新規性がある。さらに子宮頸癌の放射線治療症例について検討することにより、口腔癌・喉頭癌・食道癌・大腸癌などの細菌叢解析が可能な癌についても応用できる可能性を秘めており、今後の癌治療において意義深い知見が得ることができると考えられ、本研究を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究では、子宮頸癌の組織中マイクロバイームを解析することを主要目標とする。その解析ツールとして、これまで当研究室で十分な経験のある FFPE 腫瘍組織からの抽出 DNA および次世代シーケンサーを用いた 16s rRNA 解析を行い、子宮頸癌組織内の細菌叢を構成する細菌種の同定および構成比率の違いを明らかにする。子宮頸癌の進行度、組織型 (扁平上皮癌 vs 腺癌)、HPV 感染の有無、放射線感受性や臨床的予後との関連を解析することで、これまでになかった子宮頸癌の新たな腫瘍特性評価法を確立することを目的とする。さらに腫瘍組織 DNA を用いた遺伝子変異解析結果と比較することで、遺伝子変異と細菌叢との相互関係について検討することにより、新たな癌化メカニズムの解明に寄与する可能性もある。さらに、これまで申請者が大学院時代のメインテーマとして研究してきた、“癌免疫”および“癌微小環境”の経験に基づ

く解析 (Kobayashi A, Eur J Pharmacol, 2015. / Kobayashi A, Cancer Sci, 2014.) も追加し、組織中 DNA からの細菌叢解析と相関を比較検討する。このようにこれまでの申請者らの経験を総動員し、子宮頸癌の FFPE 組織中マイクロバイーム解析の意義について多角的に検討する点で、学術的独自性と創造性がある (図 2)。また、細菌叢と化学療法および放射線感受性・抵抗性との関連を検討することにより、子宮頸癌だけでなく他癌種の研究へと応用できる可能性があり、癌治療における重要な知見を得ることができる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 検体のサンプリング

本研究に関して和歌山県立医科大学の倫理委員会の承認を得ており、子宮頸癌症例の検体採取を開始している。当院で子宮頸癌に対し手術・放射線・化学療法を行なった症例を対象とし、患者個別にインフォームドコンセントを行い、文書にて本研究に同意を得られた症例を対象とする。腫瘍 FFPE 組織は、手術もしくは生検で得られた標本の一部を研究用腫瘍組織検体として採取する。

#### (2) 腫瘍 FFPE 組織検体からの DNA 抽出法

子宮頸癌 160 症例 (扁平上皮癌 ; 80 例、腺癌 ; 80 例) の腫瘍組織検体を解析対象とする。腫瘍 FFPE 組織検体 40  $\mu$ m 厚分 (10  $\mu$ m 薄切スライド  $\times$  4 枚) を用い、QIAamp<sup>®</sup> DNA Micro キットを用いて腫瘍 DNA を抽出し、NanoDrop および Picogreen 法で腫瘍 DNA の濃度測定を行う。

#### (3) 抽出腫瘍 DNA を用いた 16s rRNA マイクロバイーム解析法

高速シーケンス解析用アダプター配列を付加した 16s rRNA 領域特異的プライマー (V3-V4 領域) を用いて PCR 増幅および精製を行い、アガロースゲル電気泳動法で増幅を確認し、次世代シーケンサーに供するライブラリーを作製する。高速シーケンス解析用アダプター配列を付加した PCR 産物を用いて、次世代シーケンサーによる配列取得および 16s rRNA データベースに対する相同性検索および系統分類解析を行う。

#### (4) 抽出腫瘍 DNA を用いた 16s rRNA マイクロバイーム解析と臨床データとの包括的解析

上記の抽出腫瘍 DNA を用いた 16s rRNA マイクロバイーム解析結果と、子宮頸癌の進行度、組織型 (扁平上皮癌 vs 腺癌)、HPV 感染の有無、放射線感受性や臨床的予後との関連を検討する。無増悪期間、全生存期間、化学療法の奏効率、病勢コントロール率との相関についても log rank 検定を用い、Kaplan-Meier 法で検討する。

#### (5) 抽出腫瘍 DNA を用いた遺伝子変異解析

腫瘍組織検体から抽出した tumor DNA の遺伝子変異解析は、Ion AmpliSeq<sup>™</sup> Cancer Hotspot Panel v2 (Roche Diagnostics) を用いライブラリー調整を行い、次世代シーケンサーで解析を行う。COSMIC 等の遺伝子データベースを用い、検出した変異の特性について検討を行う。病的な遺伝子異常を検出し、上記の抽出腫瘍 DNA を用いた 16s rRNA マイクロバイーム解析結果との相関について検討する。

#### (6) 腫瘍組織を用いた癌微小環境解析

腫瘍 FFPE 組織検体を 2  $\mu$ m 厚に薄切し、腫瘍関連マクロファージ (CD163、CD68)・腫瘍免疫 (PD-L1、IDO)・ケモカイン (CCL5、CX3CL1) などの抗体を用いた組織免疫科学染色を行い、上記の抽出腫瘍 DNA を用いた 16s rRNA マイクロバイーム解析結果との相関について検討する。

### 4. 研究成果

当院倫理委員会の承認のもと、14 例の子宮頸癌の FFPE 組織検体での検討を行った。抽出腫瘍 DNA を用いた 16s rRNA マイクロバイーム解析を行ったところ、14 例全ての組織内細菌叢を構成する細菌種の同定および構成比率を解析することは可能であった。しかしながら、本研究では一般臨床使用を目指していたため FFPE 組織検体を使用したため、その場合コントロールとして組織のないパラフィン部分を解析し、その結果の細菌叢を引くことにより有意な細菌を同定できるが、安定した結果が出なかった。これは症例ごとの同封される細菌の違いや、無菌操作ではないことが原因として考えられた。一般臨床使用を目指すことは難しいが、腫瘍組織内の細菌叢を解析するには、無菌に近い状態で凍結組織で行うことが改善点として挙げられた。

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