

口腔内・腸内マイクロバイオームとメタボロームの網羅的解析による新たな膵癌バイオマーカーの探索

国立国際医療研究センター 消化器内科

永田 尚義

I 要 旨

本研究は、我が国で死亡数が増加している膵癌の発生病態をメタゲノミクスとメタボロミクスからアプローチする研究である。膵癌のハイリスク患者の絞り込みは困難であり、長期間の定期的な画像検査を要するため多額の医療コストが必要となる。そのため、膵癌の早期発見のための新たな非侵襲的なバイオマーカーの発見が必要である。

本研究は、膵癌患者と年齢、性別、患者背景因子をマッチした患者を対象に、口腔内細菌叢および腸内細菌叢をメタゲノム解析およびメタボローム解析で比較することで、膵癌に特徴的なバイオマーカーを同定することを目的としている。

膵癌およびコントロール症例の登録を開始した。まず、日本人における腸内細菌、口腔内細菌のプロファイルを行った。次に、メタゲノム解析から膵癌症例において特徴的な細菌種をいくつか同定した。メタボロームは解析中である。今後は、膵癌に特徴的な菌の分離培養、菌が癌の initiator になるのか、promotor になるのか病態を解明していく。さらに、多施設共同研究において結果の妥当性を検証する予定である。

II 背 景

本邦において、膵癌による死亡数は増加しており、癌の死亡順位は第 4 位である。これまで膵がんのリスク因子として、家族歴、糖尿病、肥満、喫煙などが指摘されているものの、特定

の原因は不明のままである。そのため、ハイリスク患者の絞り込みが容易ではない点が臨床上の重要な課題である。

近年、欧米から“口腔内細菌と膵癌”の関連が報告されている (Gut.2017)。また、口腔内細菌が産生する“代謝産物と膵癌”の関連も示唆されている (Metabolomics2010)。欧米の研究から、膵癌発生とある特定の口腔内細菌種 (*Neisseria elongata* と *Streptococcus mitis*) が関連しているデータが示されている (Gut.2012)。しかし、日本人と欧米人では遺伝・環境要因が異なること、細菌組成も民族間で異なるため、日本人を対象に膵癌と関連する細菌組成や代謝産物を同定する必要がある。

一方、癌発生には口腔内だけでなく腸内細菌も関与している可能性があるが、“腸内細菌と膵癌”との関連は不明である。口腔内と腸内のマイクロバイオーム (微生物) とメタボローム (代謝産物) を用いて多角的にアプローチすることで精度の高い膵癌バイオマーカーが発見できる可能性がある。

現在、マイクロバイオーム研究の多くは 16S rRNA シークエンスであるが、本研究は全ゲノム解析を行うため、細菌だけでなく、真菌、ウイルスの同定も可能であり、新規微生物マーカーが発見できる可能性がある。

III 申請者らの仮説

糖尿病、肥満、喫煙、アルコール、運動、食事などの臨床リスク因子と膵癌発生との間に腸内細菌叢の変化が関与している可能性がある。

近年、大腸癌や肝臓癌と腸内細菌との関連が報告がされており、大腸癌では腸内細菌由来の代謝物や毒素による直接的な作用が発癌に関与 (initiator) しているという機序や、肝臓癌では、代謝物が門脈を介しての腸肝循環による肝臓への影響などが考えられている (promotor)。同様に、口腔内細菌や腸内細菌が産生する代謝産物が血流を介して膵臓へ影響している可能性がある。コントロールと膵癌患者の微生物叢の違いが明らかになることで膵癌発生の新たなメカニズムが構築できる可能性がある。

IV 目 的

非膵癌患者 (control) と膵癌患者から、糞便、唾液サンプルを収集し膵癌に特徴的な微生物、代謝物質を明らかにする。

V 方 法

対象患者

1 膵癌患者 (case 群)

選択基準は、画像診断および病理学的に膵癌と診断された患者、日本人、同意取得時の年齢が20歳以上、本プロトコル研究への参加の同意が文書により得られた患者であり、除外基準は、1か月以内に整腸剤、抗生物質、抗真菌薬、抗ウイルス薬、抗寄生虫薬の投与 (静脈、筋肉、経口投与)、または、投与している患者、胆道系、膵臓および消化管手術歴のある患者、化学療法をすでに行っている患者である。

診療録および問診票を用いて、臨床情報を収集する。便、及び唾液検体は、すぐに -80°C の冷凍庫に保管する。便および唾液中の細菌DNAを抽出し、ライブラリー作成、次世代シーケンサーを用いたショットガンメタゲノムシーケンスを行う。Bioinformaticsに関しては、腸内細菌および口腔内細菌ゲノム情報、臨床情報の融合データを統計学的に解析する。様々

な交絡因子を考慮した多重検定から膵癌との関連を明らかにする。細菌ゲノムの解析は、膵癌患者とIPMN患者、膵癌患者と健常者との間でMicrobiomeの生物学的多様性を検定し、さらに、これら疾患群の間で、細菌の門、属、種、OTU (operational taxonomic unit)の違いを解析する。

2 非膵癌患者 (control 群)

選択基準は、CTやMRIで膵疾患や悪性腫瘍の合併の無い患者、日本人、同意取得時の年齢が20歳以上、本プロトコル研究への参加の同意が文書により得られた患者であり、除外基準は、抗生剤使用、胆道系、膵臓および消化管手術歴のある患者である。

Caseに対して、年齢、性別、既往歴、薬剤使用などの患者背景でマッチ (1:4以上でマッチング) したControlを抽出する。

VI 結 果

1 研究期間内におこなったこと

- ① 倫理委員会の承認：上記の研究計画に対する計画書、患者同意説明文書、撤回書を作成し、当院の倫理委員会に提出、承認を得た (承認番号2083)。
- ② 研究体制構築
- ③ 対象患者の前向き登録を開始：倫理委員会承認後に、登録を開始し、膵癌症例33例が登録された。一方、コントロールは400例を選定
- ④ 臨床班では、これまで膵癌症例、コントロール症例の糞便、唾液サンプルを収集した。具体的には、臨床情報をデータベース化した (表1)。膵癌症例とコントロール症例で臨床因子に有意差は認めてない。
- ⑤ 解析班では、唾液サンプルから口腔内細菌解析のための解析プロトコルを構築した。サンプル量、DNA抽出量共に膵癌症例とコントロール症例に有意差を認めていない (表2)。

表 1

	膵癌	コントロール
年齢	74.2 歳	72.1 歳
性別 (男)	50%	48%
身長	159.8cm	160.2cm
体重	55.8Kg	60.5Kg
アルコール摂取	42.3%	39.4%
喫煙	13%	18%

表 2

	膵癌	コントロール
サンプル量	319 ul	269ul
DNA 抽出量	119.6ng/ul	109.3 ng/ul

2 中間解析結果

唾液、糞便サンプルの両方で、膵癌患者 - 健常者の間の菌叢が統計的に有意に異なることが判明した (下図)。特に、口腔内細菌叢の方が、膵癌患者 - 健常者をより明確に区別できることが明らかとなった (下図)。これまでも口腔内細菌と膵臓癌との関連は示唆されているがメタゲノム解析での知見は乏しい。さらに、本研究のように口腔内細菌と腸内細菌、および代謝産物からの多角的アプローチによる膵臓癌予測を試みる研究は世界初である。

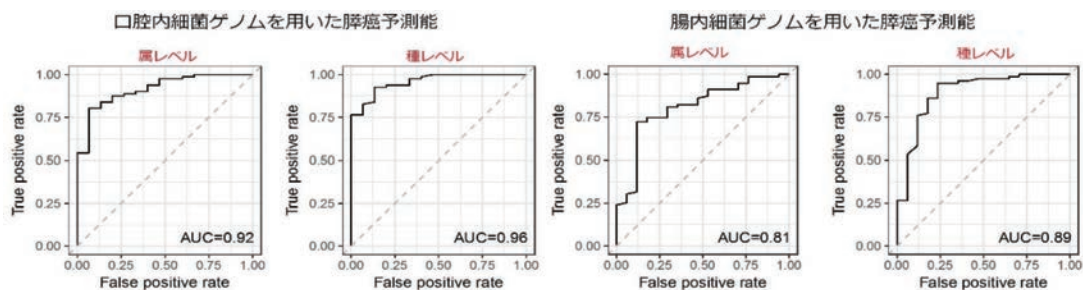
3 膵癌予測能とそれに寄与する菌種

膵癌と健常者において、口腔内細菌の組成が異なることが判明した。口腔内細菌で膵癌の予測能を調べたところ、属レベルでは 0.92、種レベルでは 0.96 と極めて高い確率で膵臓

癌を予測できることが判明した (下図)

過去の研究と比較しても高い予測能である。その理由として、癌診断の正確性、臨床情報の正確性、コントロール症例が多いこと、網羅的ゲノム解析 (メタゲノム解析) を行っていること。などが挙げられる。また、その予測に寄与する菌種も判明しており (特許出願予定のため詳細は未記載)、これらの菌種が、他施設でも再現性、妥当性が証明できれば早期診断キットを作成できる可能性がある。

症例数が順調に蓄積できており、目標症例に到達した段階で最終解析を行い、論文化を目指す。唾液採取は侵襲の少ない検査法であり、本研究を元に膵癌の新たなスクリーニング法を確立できる可能性がある。例えば、健康診断や人間ドックで唾液中の細菌ゲノムを測定することで、即座にハイリスク患者を層別でき、



EUS（内視鏡）やCT、MRIなどの精密検査を薦めることができる。大腸癌スクリーニングの便潜血検査法（それ以上の予測）のような普及をめざしたい。また、糞便細菌、メタボロームを追加することでさらに予測能は高くなる可能性もある。本知見をもとに多施設共同研究でvalidationを行っていき、膀胱癌の新たなスクリーニング法を確立したい。

VII 結 語

研究実行のためのコホート基盤を構築し、研究登録を開始した。中間解析からは唾液と糞便を用いて膀胱癌を高い確率で予測できる所見を得ており、膀胱癌患者に特徴的ないくつかの微生物種も同定した。