

# 遺伝子変異をターゲットとした膵癌関連マイクロバイームと 癌間質相互作用の解明

九州大学病院 臨床・腫瘍外科

阿部俊也

## I 要 旨

本研究では、膵癌の発症や転移、悪性度に関わる Microbiome を次世代シーケンサー (NGS) により同定し、Microbiome に関連する癌微小環境を標的とした新たな膵癌治療法の開発を目的とした。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、膵癌組織内に Microbiome が存在することを確認した。また特定の細菌が膵癌細胞の遊走能や浸潤能を促進させることを発見した。さらに、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ところ、膵同所移植群では、コントロール群と比較して異なる菌叢を形成していることが分かった。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 の相同性を評価する予定である。また膵腫瘍腫瘍自体の遺伝変異と Microbiome との関連性についても検討する予定である。

## II 背 景

近年、Fusobacterium (歯周病の原因とされるグラム陰性嫌気性桿菌) などの口腔内常在菌が膵癌発症のリスクに関わることや、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が報告されている。さらに、これまで無菌の臓器と考えられてきた膵組織内に細菌叢の存在

が確認され、特に膵癌患者の腫瘍組織は細菌量が多く、これらが化学療法抵抗性の原因となっていることが明らかになった。近年、無菌の膵癌自然発生マウスモデルにおいて、コントロール群と比較して有意に腺房-導管異形成や desmoplasia が抑制されたことが報告されており、特定の Microbiome とその他の膵癌微小環境との関連も示唆されるが、いまだ詳細は明らかになっていない。また腸内細菌叢のバランス異常 (ディスバイオシス) が癌の進展を促進することが報告される一方で、癌がディスバイオシスを誘導し、浸潤、転移を促進しているといった視点の研究はいまだない。

## III 目 的

申請者はかねてより NGS を用いた膵癌の癌間質相互作用、早期発見に関する研究を行っており<sup>1)</sup>、近年では、十二指腸液の Microbiome 解析を行い Fusobacterium などが膵癌患者において有意に検出されることを共著者として報告した<sup>2)</sup>。

これまでの経験をもとに、本研究ではヒト膵癌切除組織や膵癌自然発生マウス、膵オルガノイドを利用することにより、腸内細菌だけでなく正常膵・膵腫瘍内の Microbiome を次世代シーケンサーにより総括的に解析を行い、癌遺伝子変異と Microbiome との関係、また癌微小環境を標的とした新たな膵癌治療法を開発することを目的とした。

#### IV 方法と結果

##### ①ヒトやKPC マウスでの膵癌原発巣における

###### Microbiome の同定

腫瘍微小環境中の 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、膵癌組織内の Microbiome が存在することを確認した。(図 1)

##### ②特定の細菌の膵癌細胞に与える機能的評価

細菌 (X、Y) とヒト膵癌細胞株との直接共培養実験を行ったところ、特定の細菌 X との

共培養において、control 群と比較して膵癌細胞の遊走能および浸潤能が促進した。細菌 Y との共培養では control 群と比較した有意差は認めなかった。(図 2)

##### ③マウスの糞便を用いたアンプリコンシーケンス解析

マウスの糞便の DNA を抽出して菌叢解析を行い、糞便の菌叢の構成と比較すると、同所移植前の糞便と移植を行わなかった群と比較して同所移植群では、異なる菌叢を形成しており、膵癌細胞を移植することによりディスバイオシスを引き起こしている可能性が示唆された。(図 3)

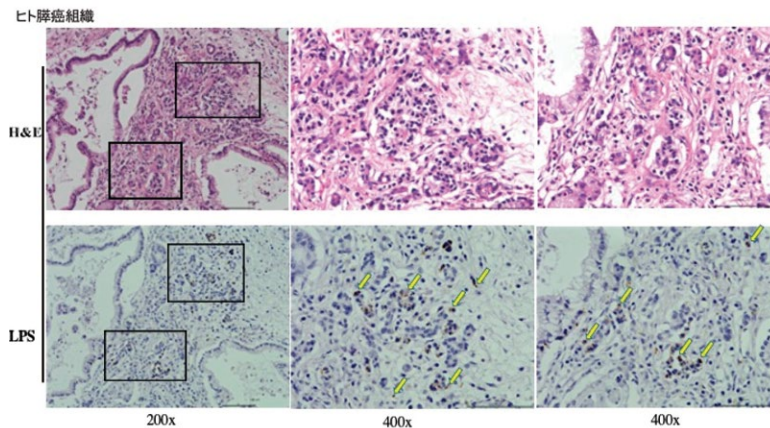


図 1

#### 膵癌細胞株と細菌の直接共培養実験

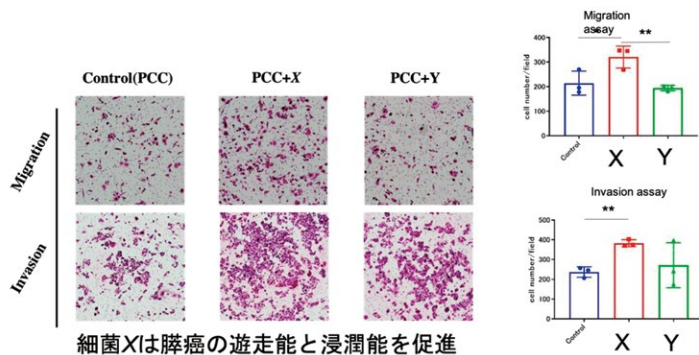


図 2

### マウスの糞便を用いたアンプリコンシーケンス解析

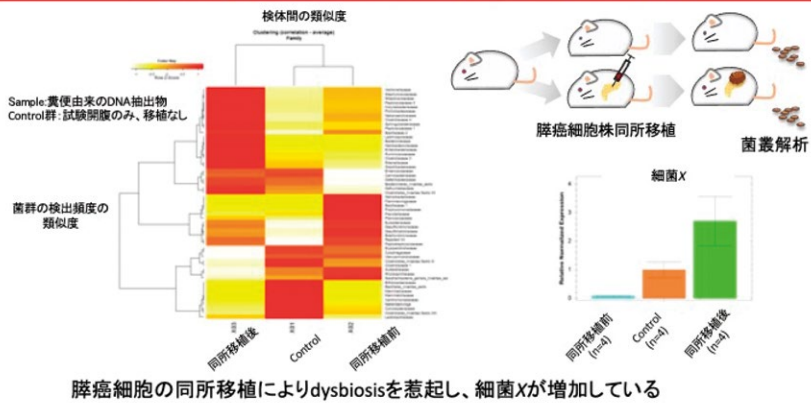


図 3

## V 考 察

現在、研究は継続中であり、今後の検討として、以下を検討している。

① 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 する。またオルガノイドに関しては、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おり(図4)、これまでに得られた膵癌促進性・抑制性に働く Microbiome の候補(細菌 X と細菌 Y)を用いて化学療法耐性に関する検討を行う。

② 腸内細菌叢の変化が膵腫瘍組織の分子生物学的特徴を変化させるかを解析するために、膵癌細胞を同所移植した近交系のマウスに、これまでの実験デザインで得られた膵癌細胞同所移植群の糞便を移植することを計画している。

### ヒト膵癌切除組織より樹立した膵癌オルガノイド

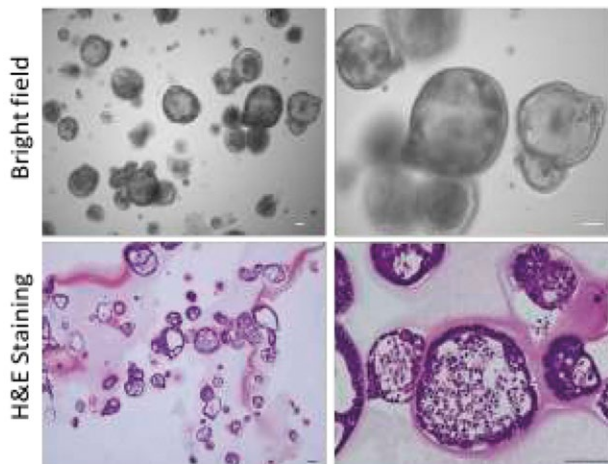


図 4

膵癌細胞同所移植群の糞便移植がもたらす腸内細菌叢の変化が膵局所に与える分子生物学的変化を RT-PCR、免疫組織化学染色検査で評価し、腸間膜リンパ節や脾臓における免疫細胞浸潤の変化をフローサイトメトリーで解析する予定である。また、糞便移植での実験が思うように進まないことに備え、膵癌がもたらす固有の腸内細菌叢形成の候補である、細菌 X と細菌 Y を研究室で培養し、糞便移植の代用として菌の経口投与を行い、糞便移植と同様の検討を行うことも検討している。

## VI 結 語

本研究により、膵腫瘍内に細菌叢が存在すること、特定の細菌が膵癌の悪性度を高めていることがわかった。また膵癌細胞自体が腸内細菌叢を改変している可能性が示唆された。今後はさらに詳細なメカニズムの解明のために検討を行っていく予定である。また膵腫瘍腫瘍自体の遺伝変異と Microbiome との関連性についても検討する予定である。

### 参考文献

- 1) Abe T, Blackford AL, Tamura K, Ford M, McCormick P, Chuidian M, Almario JA, Borges M, Lennon AM, Shin EJ, Klein AP, Hruban RH, Canto MI, Goggins M. Deleterious Germline Mutations Are a Risk Factor for Neoplastic Progression Among High-Risk Individuals Undergoing Pancreatic Surveillance. *J Clin Oncol*. 2019 May 1; 37(13): 1070-1080.
- 2) Kohi S, Macgregor-Das A, Dbouk M, Yoshida T, Chuidian M, Abe T, Borges M, Lennon AM, Shin EJ, Canto MI, Goggins M. Alterations in the Duodenal Fluid Microbiome of Patients With Pancreatic Cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020 Nov 5: S1542-3565(20)31519-6.