



Impact of Intratumoral Microbiome on Tumor Immunity and Prognosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

阿部, 晶平

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8880号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490105>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Impact of Intratumoral Microbiome on Tumor Immunity and Prognosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

膵癌腫瘍内の細菌叢が腫瘍免疫と予後に与える影響

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科学医学専攻 児玉 裕三 教授(主任教授))

阿部 晶平

【背景】

膵癌の進行は、がん細胞と腫瘍浸潤リンパ球や豊富な間質の線維化を含む腫瘍微小環境との間の複雑な相互作用によっても決定されると言われている。特に腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞は癌細胞を排除する免疫反応の重要な役割を果たし、膵癌の予後に重要な影響を与えている。また、ACTA2 (α -SMA) + 筋線維芽細胞や膠原線維などのがん関連線維芽細胞が密に存在する腫瘍間質は、低酸素性の腫瘍微小環境を誘導することにより、化学療法に対する抵抗性や膵腫瘍の進行を促進することも報告されている。しかし、このような膵癌内微小環境の形成に影響を及ぼす因子は十分には解明されていない。

以前より膵臓は無菌であると考えられていたが、最近のいくつかの研究で、膵臓の組織内に細菌が存在することが報告されている。蛍光標識した細菌を経口投与すると、数分後にマウスの膵臓で検出されたとの報告、また、ヒトの十二指腸と膵臓の細菌叢が相関しているという報告もあることから、細菌が十二指腸から膵臓に直接移行する可能性が示唆されている。さらに最近の研究では、膵癌内に細菌が存在し、腫瘍増殖に影響を及ぼす可能性も確認されている。あるマウスを用いた研究では、膵癌内の微生物叢が自然免疫および適応免疫の抑制を誘導することによって腫瘍形成を促進することが示された。しかしながら、別の研究では、細菌の多様性が高い膵癌では、多様性の低い膵癌と比較して、免疫細胞浸潤が亢進し、予後が良好であることが報告されている。このように膵癌における腫瘍常在細菌は、抗腫瘍免疫と腫瘍予後に影響を及ぼすことが示唆されているが、詳細については依然として議論の余地があり、不明な点が多い。本研究では、外科的に切除された PDAC 組織内の細菌を調査し、腫瘍内細菌が腫瘍微小環境および術後予後に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】

神戸大学医学部附属病院で 2008 年 4 月から 2017 年 3 月までに手術を受けた 162 例の膵癌患者のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片を解析した。患者の年齢、性別、BMI、CEA、CA19-9、白血球数、好中球数、総白血球数、飲酒歴、喫煙歴、糖尿病、抗生物質の投与に関する医療情報を後方視的に検討した。腫瘍の特徴として、腫瘍の大きさ、位置、病理学的病期 (UICC 第 8 版)、組織学的悪性度、手術後の残存腫瘍の状態、ネオアジュバントおよびアジュバント化学療法の既往歴が含まれた。検査データは手術前 1 ヶ月以内に収集した。

腫瘍内細菌を同定する方法として、腫瘍組織から抽出した DNA を用いて 16SrRNA 遺伝子をターゲットとした qPCR と、FFPE 切片上で同じく 16SrRNA をターゲットとした in situ hybridization を実施した。また、16S rRNA V1-2 領域の PCR 増幅を行い、シーケンスを実施した後に QIIME2 ソフトウェアを用いて菌叢解析を行った。FFPE の非組織部から得られたデータをコンタミネーションと設定し、R パッケージの "Decontam" を用いて除去を行った。また、多様性解析として Shannon 指数による α 多様性解析、重み付け UniFrac 主座標分析 (PCoA) を用いた β 多様性解析解析を、同じく QIIME2 を使用して行った。腫瘍の予後を区別するための腫瘍内細菌叢の分類は、linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) により分析した。

腫瘍浸潤リンパ球の評価として CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、FOXP3 陽性 T 細胞、CD45RO 陽性 T 細胞を、さらにマクロファージの評価として CD68 (M1 マクロファージマーカー)、CD206 (M2 マクロファージマーカー) の免疫組織化学染色をそれぞれ行った。間質内線維化の評価として、膠原繊維の染色であるエラスチカワーギンソン染色、筋線維芽細胞である α SMA の免疫染色を実施して画像解析ソフトを用いて定量化を行った。

膵癌腫瘍におけるドライバー遺伝子変異の評価に関して、KRAS、TP53、CDKN2A/p16、および SMAD4 遺伝子の変異は、FFPE から抽出した DNA を用いた次世代シーケンサー (NGS) 解析、droplet digital PCR、および免疫組織化学染色によって決定した。

統計解析には SPSS version 28.0 と GraphPad Prism 8 を使用した。データの比較はカイ二乗検定とフィッシャーの正確検定を用いた。全生存期間はカプランマイヤー法を用いて推定し、ログランク検定で比較した。ハザード比と 95%信頼区間は多変量 COX ハザードモデルを用いて検定した。P 値 0.05 以下を有意とした。

【結果】

腫瘍部から抽出した DNA を用いて、全ての原核生物が保有する 16SrRNA に対する qPCR を行ったところ、107 検体で増幅反応が検出された。さらにこれらのサンプルを 16SrRNA の In situ hybridization で評価したところ、52 例で陽性反応を認めたため、これらを腫瘍内細菌が存在する可能性が非常に高いサンプルと考え、さらなる研究の対象とした。膵癌腫瘍内細菌叢の特徴を明らかにするために、これらの 52 症例と、隣接する非腫瘍組織 26 例の 16S メタゲノム解析を行った。膵癌組織では Proteobacteria 門と Firmicutes 門が非常に多く、属レベルでは、Pseudomonas 属、Curvibacter 属、Streptococcus 属、Sphingomonas 属、Corynebacterium 属が豊富に検出された。膵癌組織と非腫瘍組織に対して、多様性解析として α 多様性、 β 多様性の解析を行ったところ、両者には有意な差を認めた。これらの所見より、腫瘍組織内は非腫瘍組織内のものとは異なる独自の細菌叢を形成している可能性が示された。

続いて、予後に関連する細菌を同定するため、52 症例を生存期間の中央値 (23.6 ヶ月) に基づいて「短期生存群」と「長期生存群」に分類した。両群間の細菌を、LEfSe を用いて解析したところ、長期生存群で 1 属、短期生存群では 10 属の菌が検出された。単変量解析にて、10 種類の属が膵癌の予後に対するハザード比の上昇に有意に関連していた。これら単変量解析にて有意差のあった 10 種類の属についてさらに多変量解析を行ったところ、Bacteroides 属、Lactobacillus 属、Peptoniphilus 属の存在が予後不良と有意に関連していることが示された。

これら 3 つの属を予後の悪化に強く関わる細菌として「prognostic bacteria」と定義した。Prognostic bacteria は全て嫌気性菌であり、それぞれの腫瘍内での存在量は、弱いながらも正の相関関係を示した。したがって、これらの予後を左右する細菌の増殖を助長する低酸素環境は、PDAC の進行に影響を及ぼす可能性があるという仮説を立てた。この仮説を検証するため、3 つの prognostic bacteria のうち少なくとも 1 つが陽性であった 24 例と、それらすべてが陰性であった 28 例との間で、臨床的特徴および腫瘍の特徴を比較した。腫瘍の大きさや病期などの臨床的特徴、また遺伝子変異、間質内線維化に関して有意差は認められなかった。CD4、CD8、CD45RO 陽性腫瘍浸潤 T 細胞の程度は、prognostic bacteria を有する腫瘍で有意に低かった (それぞれ $P=0.005$ 、 $P=0.03$ 、 $P=0.005$)。また、腫瘍関連マクロファージの評価では、有意差はなかったが、腫瘍内の免疫抑制性 M2 マクロファージの存在量 (CD206) は、prognostic bacteria が存在する群で高い傾向がみられた。Prognostic bacteria の有無による全生存期間の比較では、prognostic bacteria を有する群の生存期間が有意に不良であることが確認された ($P<0.001$)。多変量 COX ハザード解析では、prognostic bacteria の存在が独立した予後因子であることが示された ($P<0.001$ 、 $HR=3.48$, 95%CI 1.65–7.33)。さらに、膵癌における prognostic bacteria の存在量と CD4、CD8、CD45RO 陽性 T 細胞数との間には有意な負の相関が検出された (それぞれ $P=0.006$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.001$)。これらの所見から、膵癌微小環境における prognostic bacteria の存在は、予後不良につながる抗腫瘍免疫の抑制と関連していることが示唆された。

【考察】

近年、腭癌内における細菌叢の存在はいくつかの研究によって証明されている。しかし、腫瘍内の細菌叢が非腫瘍性の腭組織と異なるかどうかはまだ議論があるが、本研究において腭癌組織内には周辺組織とは異なる細菌叢がコロニー形成していることが示された。高度の線維化による乏血性、低酸素環境などの腭癌特有の腫瘍腫瘍内では、周囲組織環境とは異なる特徴的な細菌叢が形成されている可能性は十分あると考えられる。

腭癌を含む様々な悪性腫瘍において、腸内および腫瘍内の細菌叢が腫瘍内免疫生態系の制御に関与していることがいくつかの研究で報告されている。本研究では、腭癌における *Bacteroides* 属、*Lactobacillus* 属、*Peptoniphilus* 属を含む3種類の嫌気性細菌の存在量の増加が、エフェクターT細胞の腫瘍内浸潤の抑制、および腭癌の予後不良と有意に相関することを示した。既報では、腭癌における低酸素状態は、嫌気性細菌である *Porphyromonas Gingivalis* の細胞内生存を促進することが報告されており、*Fusobacterium nucleatum* など一部の嫌気性菌は免疫抑制と関連していることが示されている。したがって、腭癌組織において嫌気性細菌の増殖を可能にする低酸素性微小環境が確立され、免疫抑制を介して予後不良につながる可能性がある。特定の嫌気性細菌が何らかの機序で免疫抑制の誘導に関与しているのか、あるいは単に予後不良の腭癌に嫌気性細菌が定着しやすいだけなのか、証明するためにはさらなる研究が必要である。

【結論】

我々の知見は、腭癌内に嫌気性菌である *Bacteroides* 属、*Lactobacillus* 属、*Peptoniphilus* 属が存在することが、免疫系を介した予後の悪化と関連している可能性があることを示している。本研究は、腭癌における一部の嫌気性細菌の存在を認知することが腭癌患者のマネジメントにおいて重要であることを示唆するものであるが、その意味を十分に理解するためにはさらなる包括的な調査が必要である。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3375 号	氏 名	阿部 晶平
論 文 題 目 Title of Dissertation	Impact of Intratumoral Microbiome on Tumor Immunity and Prognosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma 癌腫瘍内の細菌叢が腫瘍免疫と予後に与える影響		
審 査 委 員 Examiner	主 査 山下 智也 Chief Examiner 副 査 勝 = 郁夫 Vice-examiner 副 査 堀 / 口 昌也 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

【背景と目的】

膵癌の進行は、がん細胞と腫瘍浸潤リンパ球や豊富な間質の線維化を含む腫瘍微小環境との間の複雑な相互作用によっても決定されると考えられている。しかし、その膵癌内微小環境の形成に影響を及ぼす因子は十分には解明されていない。近年の研究で、膵臓の組織内に細菌が存在し、さらにその細菌が腫瘍増殖に影響を及ぼす可能性が示されている。しかしながら、その膵癌腫瘍内常在細菌が、抗腫瘍免疫を含む腫瘍微小環境や疾患予後に影響を及ぼすかは未解明である。

本研究では、外科的に切除された膵癌組織内の細菌を調査し、腫瘍内細菌が腫瘍微小環境および術後の疾患予後に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】

神戸大学医学部附属病院で2008年4月から2017年3月までに手術を受けた162例の膵癌患者のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)切片を解析した。腫瘍内細菌を同定は、腫瘍組織から抽出したDNAを用いて16SrRNA遺伝子(V1-2領域)をターゲットとしたqPCR増幅産物にて行い、QIIME2ソフトウェアを用いて菌叢解析を行った。さらにFFPE切片上で16SrRNAをターゲットとしたin situ hybridizationを実施して両方で陽性の場合に菌が存在すると判断した。菌の多様性解析としてShannon指数による α 多様性解析、重み付けUniFrac主座標分析(PCoA)を用いた β 多様性分析解析を行った。腫瘍浸潤リンパ球の評価としてCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、FOXP3陽性T細胞、CD45RO陽性T細胞の免疫組織化学染色をそれぞれ行った。間質内線維化の評価として、膠原繊維の染色であるエラスチカワーゲンソン染色、筋線維芽細胞である α SMAの免疫染色を実施して画像解析ソフトを用いて定量化を行った。膵癌腫瘍におけるドライバー遺伝子(KRAS、TP53、CDKN2A/p16、およびSMAD4)の変異は、FFPEから抽出したDNAを次世代シーケンサーにて解析し、droplet digital PCR、および免疫組織化学染色によって決定した。

【結果】

腫瘍部から抽出した細菌DNAの16SrRNAメタゲノム解析にて107検体で増幅反応が検出された。さらに16SrRNAのIn situ hybridizationで評価して52例で陽性反応を認め、これらを腫瘍内細菌が存在するサンプルと考える研究対象とし、隣接する非腫瘍組織26例と比較した。膵癌組織ではProteobacteria門とFirmicutes門が非常に多く、属レベルでは、Pseudomonas属、Curvibacter属、Streptococcus属、Sphingomonas属、Corynebacterium属が豊富に検出された。

続いて、予後に関連する細菌を同定するため、52症例を「短期生存群」と「長期生存群」に分類し、両群間の細菌をLEfSeを用いて解析したところ、長期生存群で1属、短期生存群では10属の菌が検出された。単変量解析にて、10種類の属が膵癌の予後に対するハザード比の上昇に有意に関連しており、さらに多変量解析を行ったところ、Bacteroides属、Lactobacillus属、Peptoniphilus属の存在が予後不良と有意に関連していることが示された。

これら3つの属を予後の悪化に強く関わる細菌として「prognostic bacteria」と定義し、3種の菌のうち少なくとも1つが陽性であった24例と、それらすべてが陰性であった28例との間で、臨床的特徴および腫瘍の特徴を比較した。腫瘍の大きさや病期などの臨床的特徴、また遺伝子変異、

間質内線維化に関して有意差は認められなかった。一方、CD4、CD8、CD45RO 陽性腫瘍浸潤 T 細胞の程度は、prognostic bacteria を有する腫瘍で有意に低かった（それぞれ $P=0.005$ 、 $P=0.03$ 、 $P=0.005$ ）。さらに、膵癌における prognostic bacteria の存在量と CD4、CD8、CD45RO 陽性 T 細胞数との間には有意な負の相関が検出された（それぞれ $P=0.006$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.001$ ）。これらの所見から、膵癌微小環境における prognostic bacteria の存在は、予後不良につながる抗腫瘍免疫の抑制と関連していることが示唆された。

【考察】

膵癌を含む様々な悪性腫瘍において、腸内および腫瘍内の細菌叢が腫瘍内免疫生態系の制御に関与していることが報告されている。本研究では、膵癌における *Bacteroides* 属、*Lactobacillus* 属、*Peptoniphilus* 属を含む 3 種類の嫌気性細菌の存在量の増加が、エフェクター T 細胞の腫瘍内浸潤の減少、および膵癌の予後不良と有意に相関することを示した。既報では、膵癌における低酸素状態は、嫌気性細菌 *Porphyromonas Gingivalis* の細胞内生存を促進することと、*Fusobacterium nucleatum* などの嫌気性菌は免疫抑制と関連することが示された。したがって、膵癌組織において嫌気性細菌の増殖を可能にする低酸素性微小環境が確立され、免疫抑制を介して予後不良につながる可能性がある。特定の嫌気性細菌が何らかの機序で免疫抑制の誘導に関与しているのか、あるいは単に予後不良の膵癌に嫌気性細菌が定着しやすいのか、因果関係の調査研究が必要である。

【結論】

本知見は、膵癌内に *Bacteroides* 属、*Lactobacillus* 属、*Peptoniphilus* 属の嫌気性菌が存在することが、腫瘍免疫系の抑制を介した予後の悪化と関連している可能性を示している。本研究は、膵癌における一部の嫌気性細菌の存在を認知することが膵癌患者のマネジメントにおいて重要であることを示唆するものである。

本研究は、膵癌内の細菌と膵癌微小環境との関係を解析し、これまで調査されることがなかった膵癌腫瘍内細菌の免疫細胞浸潤への影響と疾患予後との関係を解明した非常に意義ある知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。