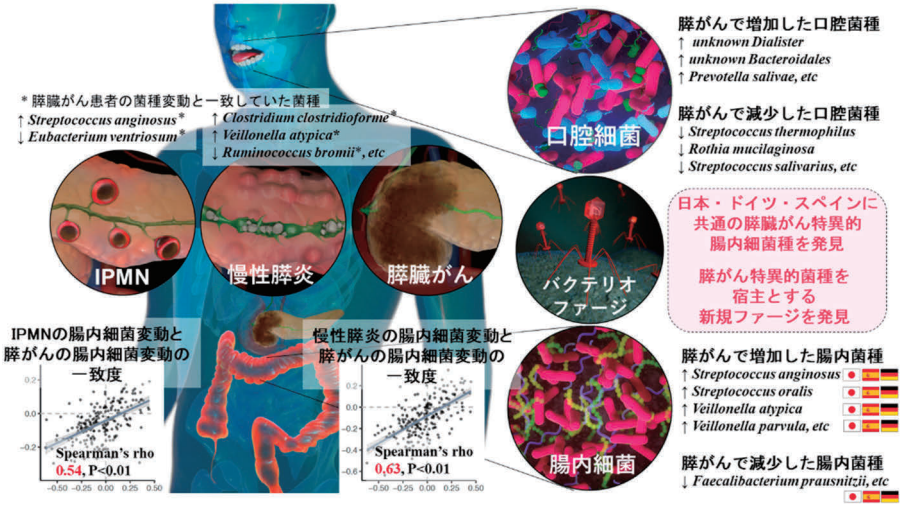
76　Bioinformaticsによる世界共通の膵臓癌予測モデル開発	永田　尚義

【目的】マイクロバイオームが膵がんの新たな診断のバイオマーカーとして利用できる可能性を検証する。また、世界で利用できるバイオマーカー同定のために、ヨーロッパ（ドイツ人とスペイン人）の口腔・腸内マイクロバイオームも調べ、日本人の結果と比較する。また、近年、動物実験から特定の腸内細菌種の存在が抗がん剤の効果を決定することが分かっているが、ヒトでは十分な研究が行われていない。そこで、膵がん患者において、マイクロバイオームが抗がん剤効果の予測のバイオマーカーになり得るかも検証する。

【方法】日本、スペイン、ドイツの多国間研究を実施した。糞便と唾液のマイクロバイオームと詳細なメタデータを前向き登録・統合しJapanese 4D（Disease Drug Diet Daily life）マイクロバイオームプロジェクトに参加した被験者のうち、未治療の膵がんを有する日本人患者47人と日本人の非膵がんコントロール235人を選出した。被験者のほとんどが高齢者であったため、絶食後、午前中に唾液サンプルを採取した。以前の研究において、大腸内視鏡検査のための腸管洗浄剤は腸内細菌叢に多大な影響を及ぼすことが示されていたため、糞便サンプルの採取は腸管洗浄後1ヶ月以内のサンプル採取は避けるようにした。唾液と糞便サンプルは、ショットガンメタゲノムシークエンスを行った。日本人コホートの腸および口腔メタゲノムデータからバクテリオファージゲノムを同定した。

【結果】日本人の膵がん患者に特徴的な口腔内・腸内細菌種を同定し、がん予測に有用であることを示した。さらに、日本人から同定した膵がんに特徴的であった腸内細菌種が、ドイツ人やスペイン人の膵がんの腸内細菌と一致することを見出した。次に、膵がんに特徴的な細菌叢が「がんの早期発見」のためのバイオマーカーとして利用できるかを検証した。口腔と腸内細菌叢の膨大な情報から機械学習法を用いて膵がんの予測能を調べたところ、特定の口腔や腸内細菌を数菌種用いると高い確率で膵がんを予測できることが判明した。さらに、従来の血液マーカー（例、CA19-9、CEAなど）と口腔や腸内細菌種を併用すると、血液マーカー単独よりも膵がんの予測精度が高まることを発見した。腸内細菌叢を「膵がん発見のマーカー」としてでだけなく、「膵がん診断後の治療効果予測」にも利用できるのではないかと考え、治療前に採取した糞便の腸内細菌と抗がん剤治療後の死亡率との関連を前向きコホート研究で調べた。死亡リスクが低いグループAに豊富に見られる菌種の多くは酪酸や酢酸など短鎖脂肪酸を産生する菌と判明した。実際、グループAの菌種を有する患者は、グループBを有する患者と比較し有意に抗がん剤治療後の生存率が長いことを見出した。短鎖脂肪酸には免疫の恒常性を保つ働きがあることが分かっており、グループAの菌種の存在が宿主の免疫応答を調整することで予後良好な結果になっている可能性が示唆された。最後に、膵がん患者で3カ国に共通して増加していた4種を宿主とする新規バクテリオファージ58種を発見した。

日本とヨーロッパで膵がんに特徴的な共通の腸内細菌種を発見



Nagata N, et al. Gastroenterology. 2022;163:222-238.より一部改変

76. Bioinformatics による世界共通の膵臓癌予測モデル開発

永田　尚義

東京医科大学 消化器内視鏡学

Key words：マイクロバイオーム，口腔内・腸内細菌，バクテリオファージ，化学療法，予後

緒　言

膵臓がん（以下膵がん）は、致死性の高い悪性新生物の一つであり、全5年生存率は5%未満である［1］。人口の増加と高齢化により、膵がんの患者数および死亡数は1990年から2017年にかけて倍増している［1］。膵がんの危険因子は、喫煙、アルコール、肥満、歯周病、糖尿病が指摘され［2］、血液や腫瘍中に膵がんの潜在的なバイオマーカーが多数同定されているが、早期膵がんを発見する有用なバイオマーカーはまだ臨床現場に導入されていない。

人体には千種類以上の常在菌が消化管に生息しており、それら常在菌やバクテリオファージの集合は総じて「マイクロバイオーム」と呼称され、ヒトの健康と病気を理解する上での重要な要素となっている。過去の報告では、16S rRNA gene amplicon sequencing（以下16S rRNA解析）を用いた解析により、膵がんとヒトの口腔内および腸内マイクロバイオームとの関連性が調査されてきた［3〜5］。また、マウスを用いた研究により、膵がんの発症病態において腸内細菌叢が関与することが示されている［5］。これらの研究は、口腔内・腸内マイクロバイオームと膵がんとの深い関わりを強く示唆している。しかし、16SrRNA解析は、PCRバイアスがありspeciesレベルの菌種同定の精度が低いことや、細菌の機能組成の同定は困難である。一方、ショットガンメタゲノム解析は、高解像度の微生物および機能的特徴の同定、および独立したコホート間でのシグネチャーの再現性の評価が可能である。膵がんにおけるバイオマーカー確立においてショットガンメタゲノム解析による網羅的微生物遺伝子同定が必要である。さらに、膵がんのバイオマーカーが他疾患と鑑別でき、他国と共通していれば強固で一般化できる。

今回、我々はショットガンメタゲノム解析を用いて口腔内や腸内の微生物遺伝子を網羅的に検出することを試み、マイクロバイオームが膵がんの新たな診断のバイオマーカーとして利用できる可能性を検証した［6］。また、世界で利用できるバイオマーカー同定のために、ドイツ人とスペイン人の口腔・腸内マイクロバイオームも調べ、日本人の結果と比較した［6］。近年、動物実験から特定の腸内細菌種の存在が抗がん剤の効果を決定することが分かっているが、ヒトでは十分な研究が行われていない。そこで、膵がん患者において、マイクロバイオームが抗がん剤効果の予測のバイオマーカーになり得るかも検証した［6］。

方　法

1. 対象

日本、スペイン、ドイツの多国間研究が実施された。参加したすべての施設で倫理委員会と施設審査委員会がこの研究の実施を承認し、すべての参加者から書面によるインフォームドコンセントを得た。糞便と唾液のマイクロバイオームと詳細なメタデータを前向き登録・統合しているJapanese 4D（Disease Drug Diet Daily life）マイクロバイオームプロジェクト［7］に参加した被験者のうち、未治療の膵管腺癌（pancreatic ductal adenocarcinoma：PDAC）を有する日本人患者47人と日本人の非膵がんコントロール235人を選出した（症例／対照比1：5）。症例比較では、PDACとマイクロバイオームとの真の関連を明らかにするために、起こりうる交絡因子についてマッチングさせたコントロール群を選択した。すなわち、年齢、性別、Body mass index（BMI）、食事・喫煙・アルコールなどの生活習慣、歯科・

口腔疾患、並存疾患、薬剤投与歴などの交絡因子が同等の割合になるようにマッチングを行った。被験者のほとんどが高齢者であったため、絶食後、午前中に唾液サンプルを採取した。糞便サンプルは、被験者が自宅で排便し、4℃および25℃で比較的安定なCary-Blair培地の入った専用チューブに入れた［8］。以前の研究において、大腸内視鏡検査のための腸管洗浄剤は腸内細菌叢に多大な影響を及ぼすことが示されていたため［9］、腸管洗浄後1ヶ月以内のサンプル採取は避けるようにした。唾液と糞便の両サンプルは、DNA抽出まで−80℃で保存された。DNA抽出後にショットガンメタゲノムシークエンスを行った。

2. スペインコホートおよびドイツコホートにおけるサンプル採取

スペインコホートでは、糞便サンプルは、がん治療を受けていないPDAC患者57人と対照者50人から、唾液サンプルは患者43人と対照者45人から採取された。ドイツコホートでは、44人のPDAC患者と32人の対照者から収集された。日本人と同じようにショットガンメタゲノム解析を行った。

3. バクテリオファージの同定

日本人コホートの腸および口腔メタゲノムデータからバクテリオファージゲノムを探索した。検出されたファージの宿主予測は、RefSeqの参照微生物ゲノムに同定されたCRISPRスペーサーのマッチングによって行われた。

結果および考察

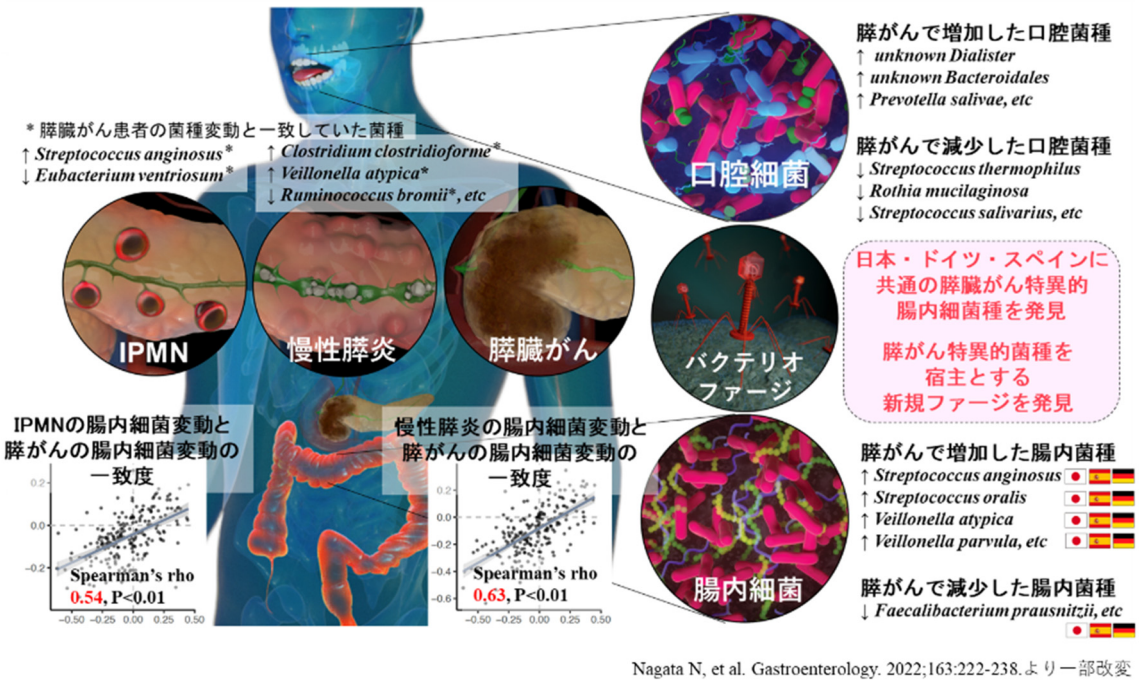
1. 膵がんに特徴的な口腔内細菌種と腸内細菌種を発見

口腔細菌517種と腸内細菌1,151種を同定し、コントロール症例と比較することで膵がん患者に特徴的な口腔細菌18種と腸内細菌30種を発見した［6］。重要なことは、日本で同定した膵がん関連腸内細菌が、ドイツ人やスペイン人の膵がん関連細菌と一致することを見出したことである（図1右下）。ヨーロッパ・日本の共通菌5種のうち、膵がんで増加した4種は、通常は腸内ではまれな口腔の常在菌であること、一方、減少した1種は短鎖脂肪酸を産生する菌であり多くの病気でその減少が報告されており［10］、免疫誘導と関わる菌であることが分かっている。

また、膵がん患者で3カ国に共通して増加していた4種を宿主とする新規バクテリオファージ58種を発見した。今回の結果は、特定の細菌の増加または減少が膵がんの発生やがん進行の原因となる可能性を示唆しており、今後それらの細菌を介した発がん機構の解明が望まれる。また、それら細菌が実際に発がんや進行の原因である場合は、それらをターゲットとするファージセラピーにより膵がんを予防または治療できる可能性があり、本研究はその基盤データを提供したことになる。

2. 膵がんと関連する腸内細菌叢と他病態と関連する腸内細菌叢

次に、膵がんで認めた特徴的な腸内細菌叢が、膵がんリスク患者群のものと類似しているのかを検証したところ、膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）や慢性膵炎の腸内細菌叢は膵がん患者のものと類似することを見出した［6］。また、慢性膵炎患者（相関係数0.63）の腸内細菌叢の方がIPMN患者（相関係数0.54）のものよりも膵がん患者の腸内細菌叢と類似していることも判明した（図1下段）。他の病気についても同様の解析を行い、膵がん患者に特徴的な腸内細菌叢は、糖尿病、炎症性腸疾患、大腸がんの腸内細菌叢とは異なっており区別できるものの、胃酸分泌抑制薬であるProton-pump inhibitor（PPI）使用者の腸内細菌叢とは類似していることを発見した。IPMN、慢性膵炎、PPI使用は膵がんリスクと関連することが報告されており［2］、今回の結果は、腸内細菌叢がこれらの病態と膵がんとを結びつける一つの要因であることを示唆している。



Nagata N, et al. Gastroenterology. 2022;163:222-238.より一部改変

図 1. 日本とヨーロッパで膵がんに特徴的な共通の腸内細菌種を発見

3. 膵がん予測に口腔内と腸内細菌種が有用であることを発見

次に、膵がんに特徴的な細菌叢が「がんの早期発見」のためのバイオマーカーとして利用できるかを検証した。口腔と腸内細菌叢の膨大な情報から機械学習法という解析法を用いて膵がんの予測能を調べたところ、特定の口腔や腸内細菌を数菌種用いると高い確率で膵がんを予測できることが判明した（図 2A）[6]。さらに、従来の血液マーカー（例、CA19-9、CEA など）と口腔や腸内細菌種を併用すると、血液マーカー単独よりも膵がんの予測精度が高まることを発見した（図 2B）。

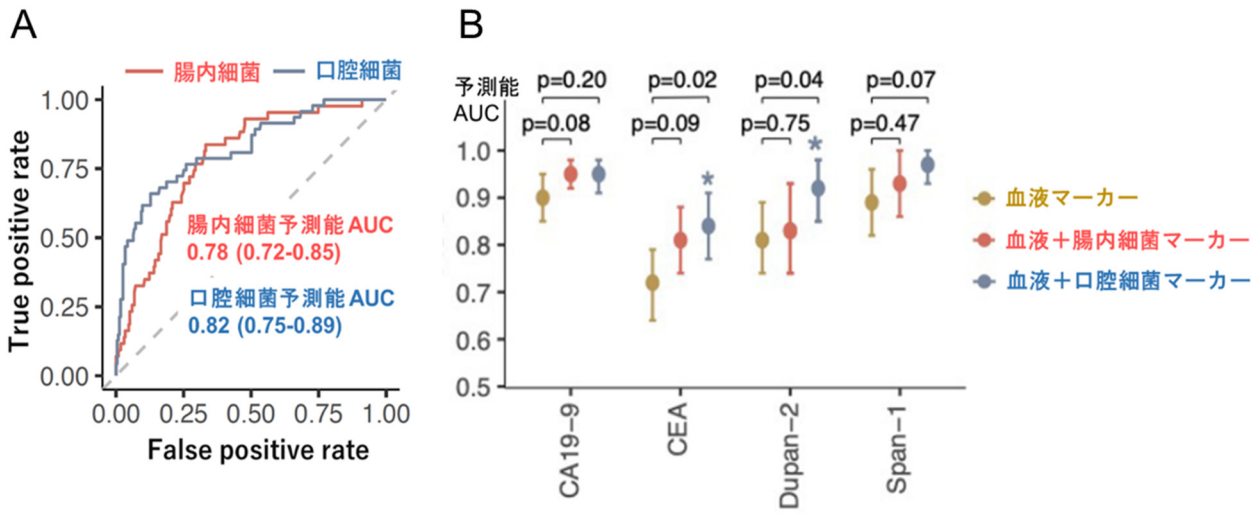


図 2. 口腔内・腸内細菌による膵がんの予測精度

A) 機械学習法による口腔内細菌を用いた膵がん予測精度と腸内細菌を用いた膵がん予測精度。

B) 血液マーカーの膵がん予測精度、血液マーカーに腸内細菌マーカーを追加した際の予測精度、血液マーカーに口腔内細菌マーカーを追加した際の予測精度を機械学習法により算出し比較した（random forest classification model）。

4. 腸内細菌種を調べることで抗がん剤の効果を予測できる可能性

腸内細菌叢を「膵がん発見のマーカー」としてだけなく、「膵がん診断後の治療効果予測」にも利用できるのではないかと考えた。そこで、治療前に採取した糞便の腸内細菌と抗がん剤治療後の死亡率との関連を前向きコホート研究で調べた［6］。まず、腸内細菌叢を用いた死亡予測モデルを作成することで、膵がん患者を死亡リスクが低い腸内細菌叢グループ A とリスクが高いグループ B に分けることが可能であった。死亡リスクが低いグループ A に豊富に見られる菌種の多くは酪酸や酢酸など短鎖脂肪酸を産生する菌と判明した（図 3A）［6］。実際、グループ A の菌種を有する患者は、グループ B を有する患者と比較し有意に抗がん剤治療後の生存率が長いことを見出した（図 3B）。短鎖脂肪酸には免疫の恒常性を保つ働きがあることが分かっており［10］、グループ A の菌種の存在が宿主の免疫応答を調整することで予後良好な結果になっている可能性が示唆された。

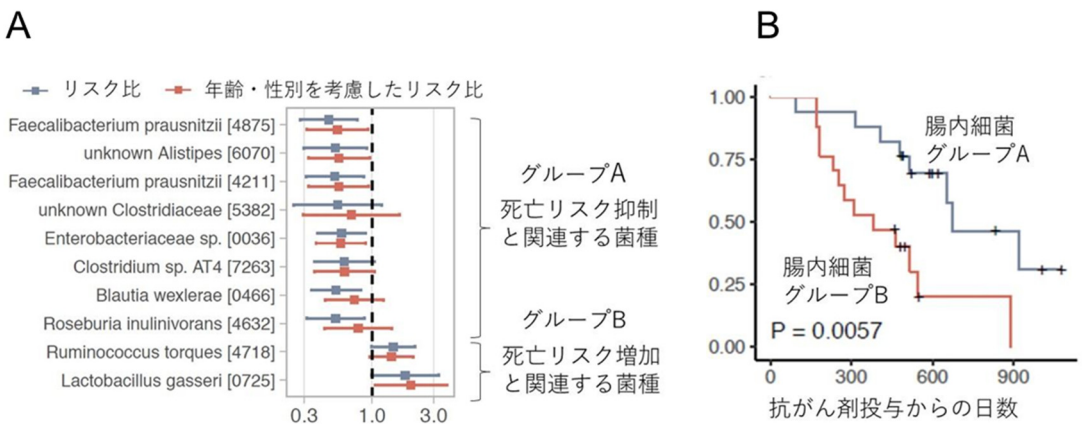


図 3. 膵がん患者における腸内細菌叢と抗がん剤投与後の予後との関係

A) Lasso COX モデルを用いて、抗がん剤投与後の予後と関連する腸内細菌グループを同定した。
グループ A は死亡リスクを抑制する菌種群であり、グループ B は死亡リスクを増加させる菌種群である。

B) グループ A の菌種を有する患者は、グループ B の菌種を有する患者よりも予後が良好であった（log-rank test）。

5. 期待される効果と発展性

本研究の成果から、マイクロバイオームをバイオマーカーとして膵がんの早期発見や抗がん剤の治療効果予測に利用できる可能性が明らかとなり、膵がんや予後のハイリスク患者の絞り込みから膵がん診療における個別化医療の実現が期待できる。また、従来の血液腫瘍マーカーと唾液や糞便マーカーと組み合わせることで、より早期の膵がん発見が可能となり、治療率向上と予後改善が期待できる。さらに、膵がんに特異的な腸内細菌に感染するバクテリオファージの同定は、がんの発生や進行を抑制することを目指したファージセラピーの研究開発を促進させる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立国際医療研究センター消化器内科の小島康志医長、久田裕也医師、忌部航医師（現：小田内科院長）、糖尿病研究センターの植木浩二郎センター長、感染症制御研究部の秋山徹室長、欧州分子生物学研究所の西嶋傑、PeerBork らの研究グループである。

文　献

1) Søreide K, Stättner S. Textbook of Pancreatic Cancer: Principles and Practice of Surgical Oncology. Springer Nature; 2021.
2) McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. World J Gastroenterol. 2018;24:4846–61. PMID: 30487695
3) Farrell JJ, Zhang L, Zhou H, Chia D, Elashoff D, Akin D, et al. Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. Gut. 2012;61:582–8. PMID: 21994333
4) Ren Z, Jiang J, Xie H, Li A, Lu H, Xu S, et al. Gut microbial profile analysis by MiSeq sequencing of pancreatic carcinoma patients in China. Oncotarget. 2017;8:95176–91. PMID: 29221120
5) Akshintala VS, Talukdar R, Singh VK, Goggins M. The Gut Microbiome in Pancreatic Disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2019;17:290–5. PMID: 30144522
6) Nagata N, Nishijima S, Kojima Y, Hisada Y, Imbe K, Miyoshi-Akiyama T, et al. Metagenomic Identification of Microbial Signatures Predicting Pancreatic Cancer From a Multinational Study. Gastroenterology. 2022;163:222–38. PMID: 35398347
7) Nagata N, Nishijima S, Miyoshi-Akiyama T, Kojima Y, Kimura M, Aoki R, et al. Population-level Metagenomics Uncovers Distinct Effects of Multiple Medications on the Human Gut Microbiome. Gastroenterology. 2022;163:1038–52. PMID: 35788347
8) Nagata N, Tohya M, Takeuchi F, Suda W, Nishijima S, Ohsugi M, et al. Effects of storage temperature, storage time, and Cary-Blair transport medium on the stability of the gut microbiota. Drug Discov Ther. 2019;13:256–60. PMID: 31611489
9) Nagata N, Tohya M, Fukuda S, Suda W, Nishijima S, Takeuchi F, et al. Effects of bowel preparation on the human gut microbiome and metabolome. Sci Rep. 2019;9:4042. PMID: 30858400
10) Corrêa-Oliveira R, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Vinolo MAR. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. Clin Transl Immunology. 2016;5:e73. PMID: 27195116