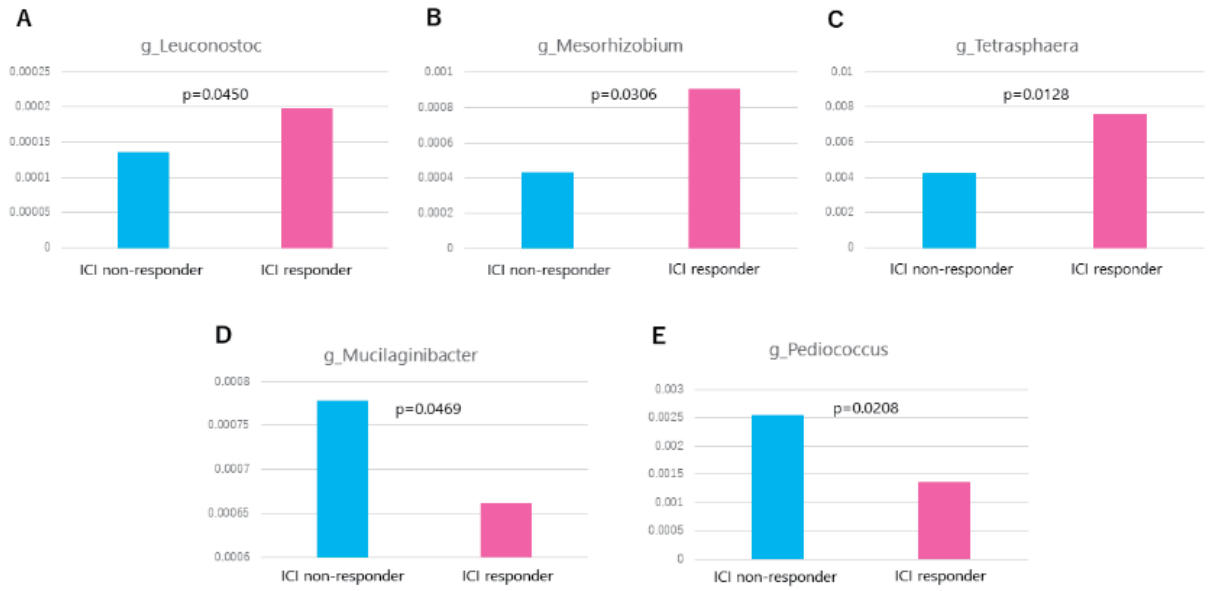
204　肺内細菌叢dysbiosisによる肺癌悪性度獲得機序の解明	庄司　文裕

【目的】近年、全身の各臓器には常在細菌叢が存在しており、各臓器に発生した癌腫瘍内にもこうした常在菌の存在が確認されている。しかしながら、肺癌における肺腫瘍内細菌叢の存在やその機能については詳細な解析は行われていない。本研究の目的は、進行／再発非小細胞肺癌において癌免疫療法を施行した症例を対象として、肺癌内の細菌叢の同定とその機能解析を行い、免疫チェックポイント阻害剤（抗 PD-1 抗体及び抗 PD-L1 抗体）効果との関連性を検索することである。

【方法】腫瘍内 PD-L1 蛋白発現強陽性（TPS≧50%）を認め、免疫チェックポイント阻害剤（immune-checkpoint inhibitor：ICI）による癌免疫療法を施行された非小細胞肺癌 32 症例を対象として肺腫瘍内細菌叢をショットガンメタゲノム解析にて明らかにし癌免疫療法奏効との関連を解析した。

【結果】RECIST criteria（ver. 1.1）にて ICI による効果判定を行ったところ、Complete response（CR）0 例、partial response（PR）18 例、stable disease（SD）4 例、progression disease（PD）10 例であった。PR 症例を ICI レスポンダー（n＝18）と SD 及び PD 症例を ICI 非レスポンダー（n＝14）と定義し、以降の解析に用いた。門レベルにおいて 19 種の肺腫瘍内細菌叢を認めた。p_Firmucutes、p_Proteobacteria、p_Actinobacteria、p_Apicomplexa が上位菌種を占めていた。一方、属レベルでは 121 種の肺腫瘍内細菌叢を認めた。属レベルにおいて ICI レスポンダーでは g_Leuconostoc（p＝0.0450）、g_Mesorhizobium（p＝0.0306）、g_Tetrasphaera（p＝0.0128）を有意に多く認めた。一方、ICI 非レスポンダーでは g_Mucilaginibacter（p＝0.0469）、g_Pediococcus（p＝0.0208）を有意に多く認めた。ICI レスポンダーと ICI 非レスポンダーとの肺腫瘍内細菌叢の機能解析を行ったところ、統計学的有意差（p＜0.05）のある合計 28 機能が明らかとなった。

ICI レスポンダーと ICI 非レスポンダー間における肺癌腫瘍内細菌叢の相違（属レベル）



204. 肺内細菌叢 dysbiosis による肺癌悪性度獲得機序の解明

庄司　文裕

九州がんセンター 呼吸器腫瘍科

Key words：非小細胞肺癌，肺腫瘍内細菌叢，免疫チェックポイント阻害薬

緒　言

我々の体内には至る所に細菌が存在しており、腸内細菌を中心とした宿主内細菌叢は宿主免疫の一翼を担っていることが示唆されている。肺内も例外でなく、従来、正常肺組織は無菌であると信じられてきたが、正常肺内にも常在菌が存在することが明らかになった［1］。気道内腔が喫煙・大気汚染・ウイルス・アレルゲン・有毒物質に暴露され、気道上皮～粘膜固有層に炎症が惹起されると、肺内細菌叢発育環境の変化が肺内細菌叢の破綻つまり dysbiosis（細菌叢の多様性や菌種構成の変化）を招き、呼吸器疾患の発症に繋がると報告されている［2, 3］。加えて肺癌発癌との関連性が示唆されている肺内細菌叢も明らかになってきた。しかしながら腸内細菌叢研究と比較して肺内細菌叢研究はいまだ発展途上であり、特に肺癌における肺腫瘍内細菌叢に対する基礎及び臨床研究は少なく、肺内細菌叢における肺局所免疫制御機構や肺癌癌悪性度との関連性もいまだ解明されていない。

本研究の目的は、進行／再発非小細胞肺癌において癌免疫療法を施行した症例を対象として、肺癌内の細菌叢の同定とその機能解析を行い、免疫チェックポイント阻害剤（抗 PD-1 抗体及び抗 PD-L1 抗体）効果との関連性を検索することである。

方　法

非小細胞肺癌患者で、採取された腫瘍細胞/組織凍結標本が利用可能で、かつ試料等の研究への利用につき、包括同意が得られているものを対象とした。腫瘍内 PD-L1 蛋白発現強陽性（TPS≧50%）を認め、免疫チェックポイント阻害剤（immune-check point inhibitor：ICI）による癌免疫療法を施行された患者の肺腫瘍内細菌叢をショットガンメタゲノム解析にて明らかにした。合計 32 症例の非小細胞肺癌症例を対象に、肺腫瘍内細菌叢菌種やと癌免疫療法奏効との関連を解析した。統計解析は JMP ver.13（SAS Institute、Cary、NC）を使用して行い、ICI のレスポンスにより 2 群に分け、Kaplan-Meier 法を用いて検定した。ショットガンメタゲノム解析は、メタゲノム DNA からショットガンライブラリーを作製後、イルミナシーケンサーを用いてシーケンスデータを取得、取得したリードについて、データベース配列へのマッピングにて菌種組成を明らかにした。またアセンブルにより菌叢の持つ代謝機能を明らかにした。

結　果

1．32 症例の臨床病理学的特徴

32 症例の臨床病理学的特徴は、年齢の中央値は 70 歳（49～86）、男性 26 例、女性 6 例であった。腺癌が 20 例、扁平上皮癌が 6 例、その他が 6 例であった。ECOG PS は 0／1／2 が 12／18／2 例であった。喫煙歴は現喫煙/過去喫煙／非喫煙が 10／17／5 例であった。治療ラインは 1st／2nd／3rd 以降が 23／5／4 例であった。脳転移を有する症例が 6 例、骨転移を有する症例が 3 例、肝転移を有する症例が 2 例であった。28 例が ICI 単

剤で治療され、4 例が ICI とがん化学療法（殺細胞性抗癌剤）との併用で治療された。本研究の観察期間中に 32 症例中 15 症例（46.9%）が生存していた。

2. 抗腫瘍効果と ICI レスポンダーの定義

RECIST criteria（ver. 1.1）にて ICI による効果判定を行ったところ、Complete response（CR）0 例、partial response（PR）18 例、stable disease（SD）4 例、progression disease（PD）10 例であった。PR 症例を ICI レスポンダー（n＝18）と SD 及び PD 症例を ICI 非レスポンダー（n＝14）と定義し、以降の解析に用いた。

3. ICI レスポンダーと ICI 非レスポンダーの無増悪生存期間と全生存期間の比較

図 1 に ICI レスポンダー（PR 症例、n＝18）と ICI 非レスポンダー（SD＋PD 症例、n＝14）における無増悪生存期間（progression-free survival：PFS）と全生存期間（overall survival：OS）の比較を行った。PFS の中央値は ICI 非レスポンダーで 266 日に対して ICI レスポンダーは 1,384 日と有意に延長していた（p＝0.0050）。一方、OS の中央値は ICI 非レスポンダーで 654 日に対して ICI レスポンダーは未達と有意に延長していた（p＝0.0038）。

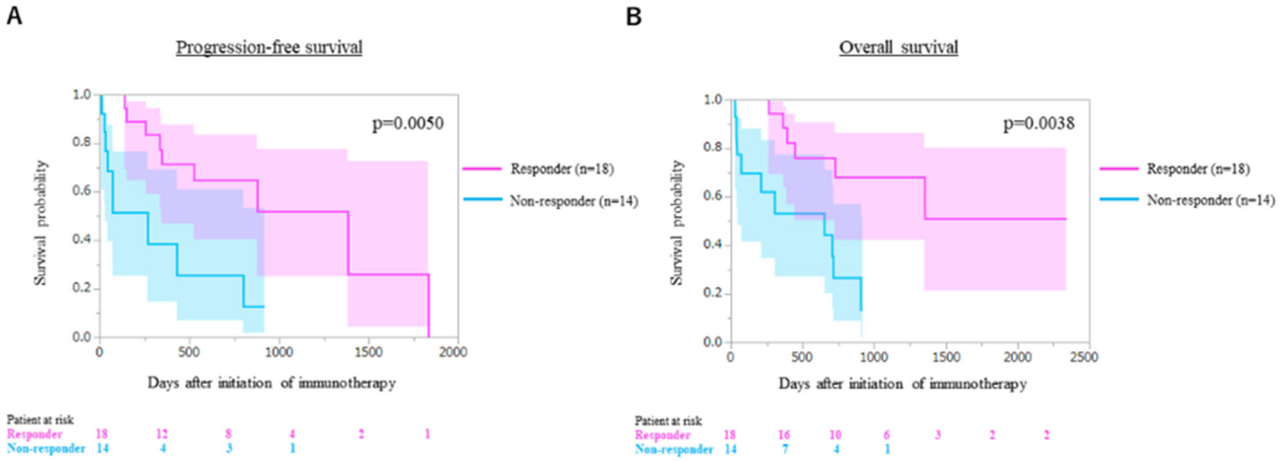


図 1. ICI レスポンダーと ICI 非レスポンダーの無増悪生存期間（PFS）と全生存期間（OS）の比較
ICI レスポンダー（ピンク）は ICI 非レスポンダー（青）と比較して、PFS 及び OS ともに有意に延長していた（PFS：p＝0.0050、OS：p＝0.0038）。

4. 肺腫瘍内細菌叢の内訳

門レベルにおいて 19 種の肺腫瘍内細菌叢を認めた（図 2A）。p_Firmucutes、p_Proteobacteria、p_Actinobacteria、p_Apicomplexa が上位菌種を占めていた。一方、属レベルでは 121 種の肺腫瘍内細菌叢を認めた（図 2B）。属レベルにおいて ICI レスポンダーでは g_Leuconostoc（p＝0.0450）、g_Mesorhizobium（p＝0.0306）、g_Tetrasphaera（p＝0.0128）を有意に多く認めた（図 3A～E）。一方、ICI 非レスポンダーでは g_Mucilaginibacter（p＝0.0469）、g_Pediococcus（p＝0.0208）を有意に多く認めた。

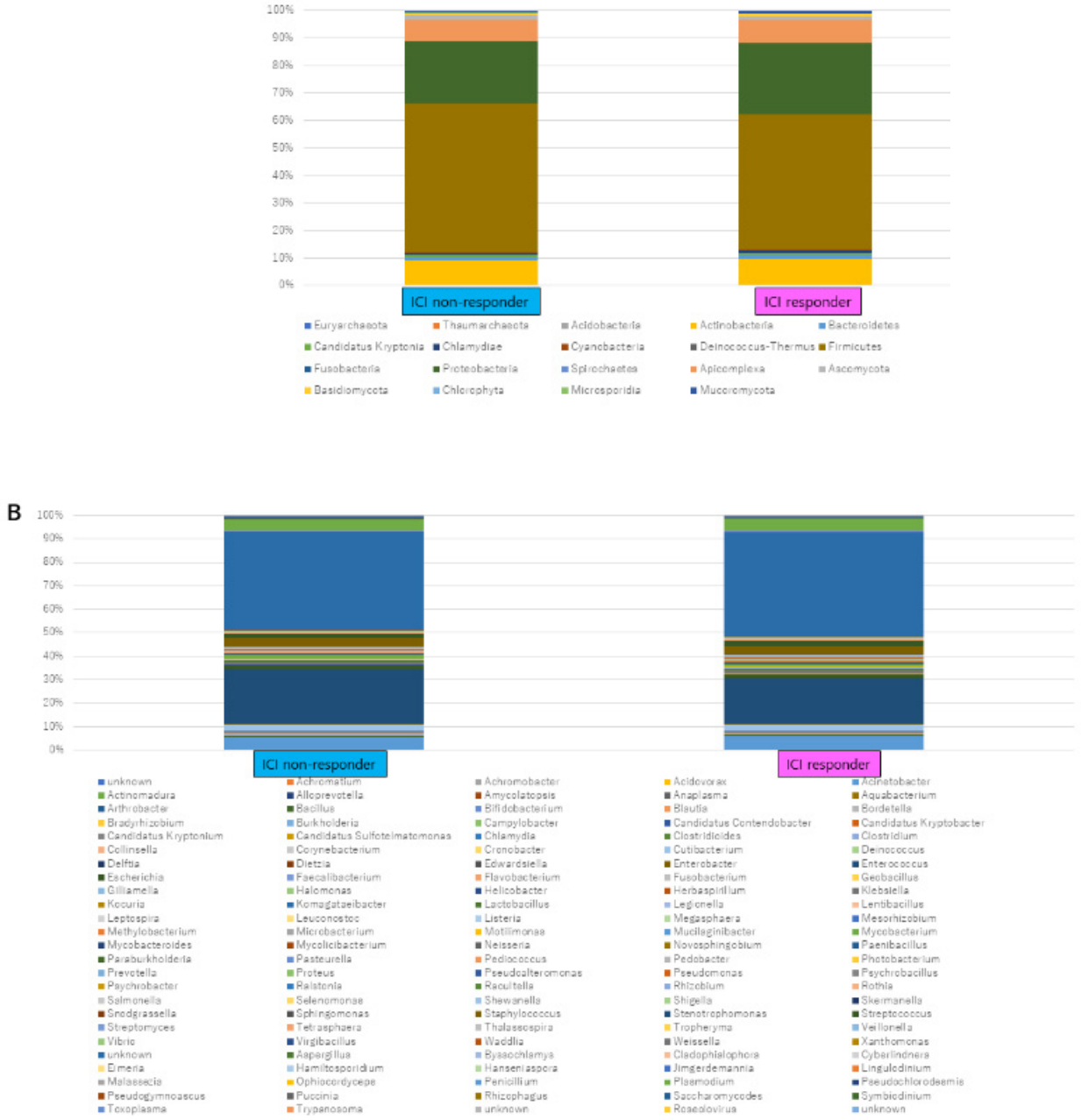


図 2. 肺癌腫瘍内細菌叢の内訳

門レベル（A）、属レベル（B）における肺癌腫瘍内細菌叢の割合を示した。

ICIレスポンダー（ピンク）、ICI非レスポンダー（青）。

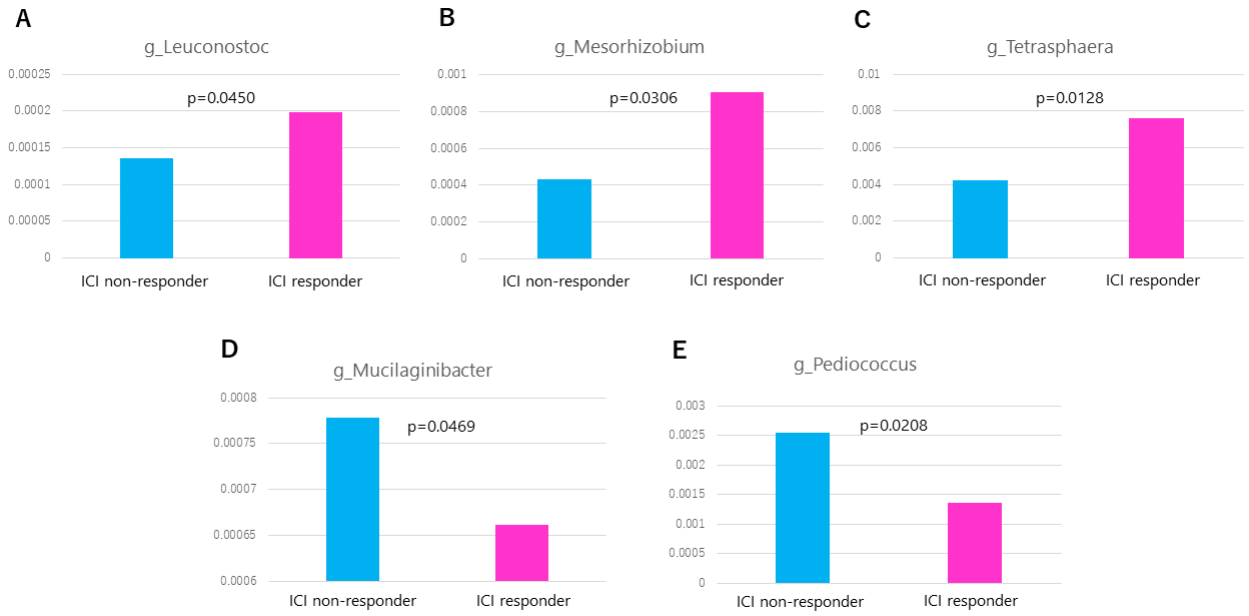
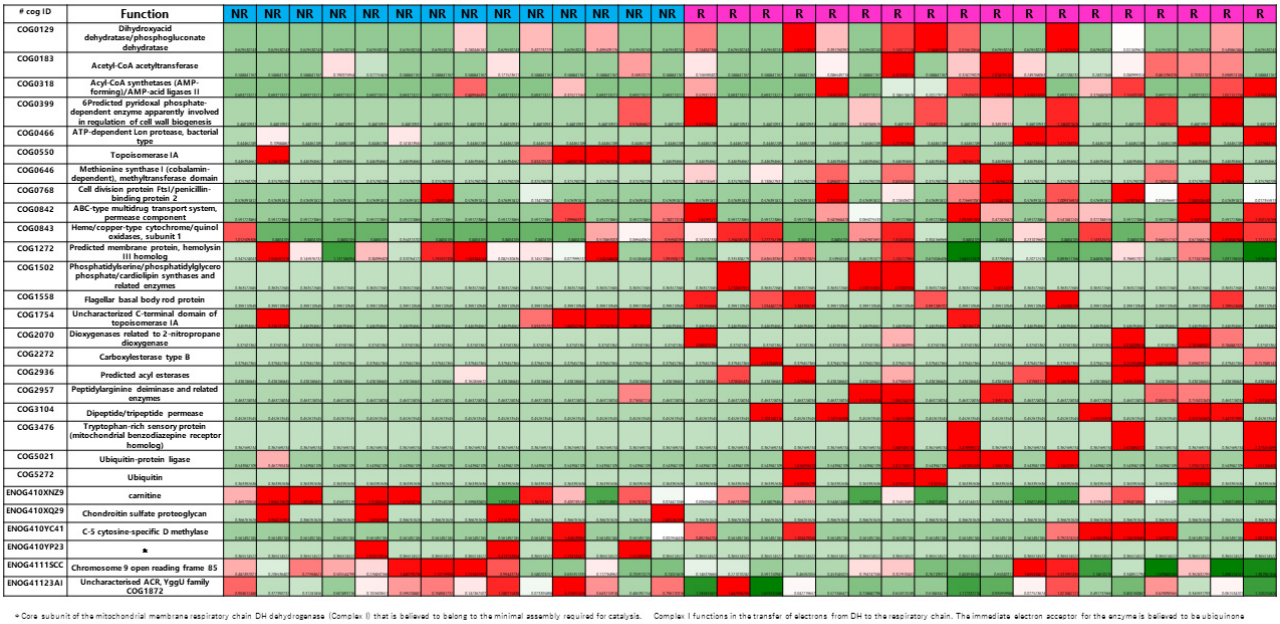


図 3. ICI レスポンダーと ICI 非レスポンダー間における肺癌腫瘍内細菌叢の相違（属レベル）
2 群間において統計学的有意差（$p<0.05$）を認めた細菌叢（属レベル）を示した。
ICI レスポンダー（ピンク）、ICI 非レスポンダー（青）。

5. 肺腫瘍内細菌叢の機能解析

ICI レスポンダーと ICI 非レスポンダーとの肺腫瘍内細菌叢の機能解析を行ったところ、統計学的有意差（$p<0.05$）のある合計 28 機能が明らかとなった（図 4）。



* Core subunit of the mitochondrial membrane respiratory chain DH dehydrogenase (Complex I) that is believed to belong to the minimal assembly required for catalysis. Complex I functions in the transfer of electrons from DH to the respiratory chain. The immediate electron acceptor for the enzyme is believed to be ubiquinone

図 4. 肺癌腫瘍内細菌叢における遺伝子機能解析
階層的クラスタリング結果、統計学的有意差（$p<0.05$）を認め、遺伝子機能が明らかなものを示した。ICI レスポンダー（ピンク）、ICI 非レスポンダー（青）

考　察

近年、全身の各臓器には常在細菌叢が存在しており、各臓器に発生した癌腫瘍内にもこうした常在菌の存在が確認されている［4］。近年、腸肺相関（Gut-lung axis）という概念が提唱されており、腸内細菌叢と肺内細菌叢の相互作用により、全身免疫や局所免疫に重要な役割を果たしているとするものである。しかしながら、肺癌における肺腫瘍内細菌叢の存在やその機能については詳細な解析は行われていない。

免疫チェックポイント阻害剤（Immuno-check point inhibitor：ICI）に代表される癌免疫療法は肺癌を含む様々な癌腫に適応となっている。特に免疫チェックポイント阻害剤（ICI）を中心とする癌免疫療法は肺癌治療における第 4 の柱としてその地位を確立した。Programmed death-ligand-1（PD-L1）をターゲットとする様々な抗 PD-1 抗体／抗 PD-L1 抗体が開発されているが、抗 PD-1 抗体は単剤療法として非小細胞肺癌患者の約 20%程度にしか効果を認めないのが現状である。近年、ICI の効果は腸内細菌叢によって修飾されることが報告された。腸内細菌の多様性と特定細菌の豊富さが抗 PD-1 抗体の有効性に関連することが報告された［5］。腸内細菌叢の多様性を示した症例やある特定の菌種を多く含む症例が ICI 効果を示し、予後も良好であることが報告され、こうした症例は末梢血のリンパ球数や NK 細胞数が有意に増加していることが示された。更に抗 PD-1 抗体が奏効した症例の腸内細菌を抗 PD-1 抗体が無効であった症例に移植した後に抗 PD-1 抗体を再投与したところ、抗 PD-1 抗体が奏効に転じたことが報告された。

我々は、進行／再発非小細胞肺癌症例における ICI 投与前免疫栄養学的指数（prognostic nutritional index：PNI）が ICI 効果予測因子であり、宿主側免疫栄養状態が ICI 効果に関与する可能性を明らかにした［6］。更に ICI 投与中の進行／再発非小細胞肺癌 28 症例（レスポンダー17 症例、非レスポンダー11 症例）の腸内細菌叢を解析した結果、レスポンダーの腸内細菌叢は非レスポンダーと比較して有意にα多様性が高かった。属レベルにおいてレスポンダーでは *Blautia* 属を有意に多く認め、非レスポンダーでは RF32 目に属する未同定分類群が有意に多く認められた［7］。非小細胞肺癌における ICI の効果予測バイオマーカーとして腫瘍内 PD-L1 蛋白発現が用いられている。

しかしながら、腫瘍内 PD-L1 蛋白高発現症例であっても ICI の治療効果が乏しい症例も多く認められることから、腫瘍内 PD-L1 蛋白発現をはじめとした腫瘍側因子のみならず、免疫栄養状態あるいは体内細菌叢といった宿主側因子からのアプローチも必要と考えた。そこで腫瘍内 PD-L1 蛋白高発現非小細胞肺癌症例を対象として、肺腫瘍内細菌叢と ICI 治療効果とに関連性があるのではないかとの仮説のもとに本研究を立案した。結果、ICI レスポンダーと ICI 非レスポンダーとの間に肺腫瘍内細菌叢に統計学的に相違のある 5 種の細菌種（Leuconostoc 属、Mesorhizobium 属、Tetrasphaera 属、Mucilaginibacter 属、Pediococcus 属）が明らかになった。また ICI レスポンダーあるいは ICI 非レスポンダーにおいて構成する肺腫瘍内細菌叢の 28 種の遺伝子機能解析結果も明らかとなった。本研究で得られた細菌種や機能については更なる詳細な分析・解釈を必要とするが、こうした特定の菌種や機能が癌免疫療法の効果に影響を及ぼしていることは間違いなさそうである。今後は本研究の解析結果から肺腫瘍内細菌叢に着目した癌免疫療法の効果予測バイオマーカーの開発に発展する可能性もある。また腸肺相関の観点からバイオティクスによる腸内細菌叢のコントロールにより、間接的に肺内細菌叢をコントロールすることで非小細胞肺癌における癌免疫療法の効果増強効果を目指した新規治療にも繋げていきたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立病院機構九州がんセンター呼吸器腫瘍科の武田洋子、小齊啓祐、藤下卓才、豊澤亮、伊藤謙作、山口正史、岡本龍郎である。

また本研究を全面的に支援してくださった上原記念生命科学財団の方々に心から感謝致します。

文　献

1） Yu G, Gail MH, Consonni D, Carugno M, Humphrys M, Pesatori AC, et al. Characterizing human lung tissue microbiota and its relationship to epidemiological and clinical features. Genome Biol. 2016;17（1）:163.　doi: 10.1186/s13059-016-1021-1.

2） Mao Q, Jiang F, Yin R, Wang J, Xia W, Dong G, et al. Interplay between the lung microbiome and lung cancer. Cancer Lett. 2018;415:40-8.　doi: 10.1016/j.canlet.2017.11.036.

3） Dickson RP, Martinez FJ, Huffnagle GB. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. Lancet. 2014;384（9944）:691-702.　doi: 10.1016/S0140-6736（14）61136-3.

4） Nejman D et al. The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. Science 2020; 368（6494）: 973-980. doi: 10.1126/science.aay9189.

5） Routy B et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. Science. 2018; 359: 91-97. doi: 10.1126/science.aan3706.

6） Shoji F et al. Pretreatment prognostic nutritional index as a novel biomarker in non-small cell lung cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors. Lung Cancer. 2019; 136: 45-51. doi: 10.1016/j.lungcan.2019.08.006.

7） Shoji F et al. Gut microbiota diversity and specific composition during immunotherapy in responders with non-small cell lung cancer. Front Mol Biosci 2022; 9: 1040424. doi: 10.3389/fmolb.2022.1040424.