

令和2年度シニア・リサーチフェロー
研究成果報告書

2021年6月1日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団
理事長 堀田 知光 殿

報告者氏名： 柴 知史



研究課題：日本人腸内細菌叢・代謝物質解析によるがん免疫治療最適化バイオマーカーの探索
(テーマ) 患者に優しい新規医療技術開発に関する研究

研究期間： 自 2020年4月1日
至 2021年3月31日

研究指導者：氏名 柴田 龍弘



公益財団法人 がん研究振興財団

(1) シニア・リサーチフェロー期間中の研究について

1) 要旨

腸内細菌叢は、食事などの生活習慣や人種の違いによって多彩な像を示すことが知られている。これまで我々は、国立がん研究センター中央病院を受診された患者に対して個別に同意を取得し、日本人 3700 症例以上の便検体と被検者の臨床情報及び食生活などのアンケート調査の集積と、次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢メタゲノム解析並びに腸内代謝物質メタボローム解析の基盤を確立してきた。こうした研究基盤を元に、大腸がんに関連する腸内細菌叢について、イタリア及びドイツの研究グループと共同研究を行い、人種間で共通して進行大腸がんの特徴的な腸内細菌群があることを報告した (Thomas AM, [Shiba S](#), et al. *Nat Med* 2019, Wirbel J, [Shiba S](#), et al. *Nat Med* 2019)。さらに多発ポリープ (腺腫) や早期大腸がん (粘膜内がん) 症例の便中にすでに特徴的な細菌や代謝物質が存在することを世界で初めて明らかにし (Yachida S, [Shiba S](#), et al. *Nat Med* 2019)、胃切除後症例及び大腸切除後症例の腸内環境の変化についても報告してきた (Erawijantari PP, [Shiba S](#), et al. *Gut* 2020)。発がんリスクとの関係に加えて、がんにおける個別化治療の最適化にメタゲノム解析を応用することを目指し、これまでフルオロウラシル (5-FU) による副作用が、特定の腸内細菌の存在によって軽減されることを見出している。

本提案では、これまでの研究成果と実績を元に、新たなバイオマーカーによる症例層別化や副作用軽減により患者負担を減らすことを目的として、免疫チェックポイント阻害剤の治療反応性と腸内細菌叢の関係に着目し、「日本人腸内細菌叢・代謝物質解析によるがん免疫治療最適化バイオマーカーの探索」(以下、「本研究」)を進めている (Yamamoto S, [Shiba S](#), et al. *Future Oncol* 2020)。現在、国立がん研究センター中央病院を含め、多施設で登録されたがん患者の臨床情報とサンプルが収集され、データ解析を開始している。

2) 序

本研究を開始する以前より、様々な背景のがん患者から臨床情報、アンケート情報等のメタデータを収集し、当該患者の腸内細菌叢及び腸内代謝物質による腸内環境との関連を、これまで報告してきた(「要旨」参照)。更に我々は、フッ化ピリミジン系の代謝拮抗薬である 5-FU による副作用の発現と特定の腸内細菌種が密接に関連していることを示唆するデータを得た。そこで、近年、数多くのがん種に有効性が証明されている、免疫チェックポイント阻害剤の治療反応性 (有効性及び有害事象の発現) と腸内細菌叢との関連について、最先端の解析技術によってより詳細な検討が必要と考え、本研究を立案した。メタゲノム解析による腸内細菌種とメタボローム解析による腸内代謝産物のスクリーニングを行い、新たなバイオマーカーの探索を目指すと同時に、同定した細菌種の機能解析から代謝経路あるいは代謝物質を活用し、免疫チェックポイント阻害剤の新たな賦活化治療の開発も視野に入れる点で、過去の研究には見られない斬新性を有している。我々のグループでは、これまでの研究実績から、本研究を遂行する上で十分な技術的な背景も持っている。

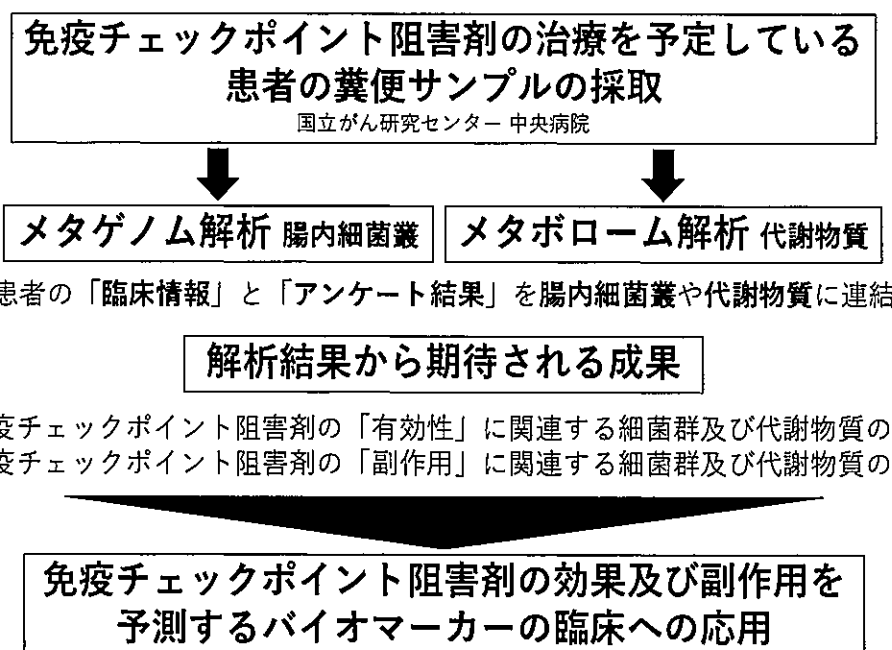
得られた腸内環境のデータを用いて、患者背景や臨床情報（アンケートデータなど）、免疫チェックポイント阻害剤による治療反応性との関連を解析する。これらにより、今後の免疫チェックポイント阻害薬の使い方にかかわる重要な知見が得られることを期待する。

本研究を進めることで、腸内環境のプロファイルに基づいた免疫チェックポイント阻害剤に対する患者層別化や免疫チェックポイント阻害剤の治療効果及び副作用を予測する新たなバイオマーカーの同定などの研究基盤を確立する。特徴的な代謝物質との関連を明らかにできれば、便移植のような手法を取らない、より簡便で、副作用が少なく治療効果が増強する免疫賦活化腸内環境を誘導する新たな創薬への展開も期待される。

3) 実験方法

本研究において、ターゲットとしている腸内細菌は、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果及び副作用の発現に関与する細菌群である。本研究の概略図を以下に示した。免疫チェックポイント阻害剤による治療を行う前に、書面で同意取得を得たがん患者より便サンプルを採取する。これらのサンプルから細菌由来の DNA を抽出し、メタゲノム解析（全ゲノムショットガンシーケンス）を行う。更に、同時に採取した別の便サンプルを用いて、包括的な腸内代謝物質メタボローム解析を行う。これらの解析によって得られた腸内環境の情報と、当該患者の臨床情報、アンケート情報等のメタデータを連結させ、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果及び副作用の発現の有無と関連する細菌種並びに代謝物質を同定する。

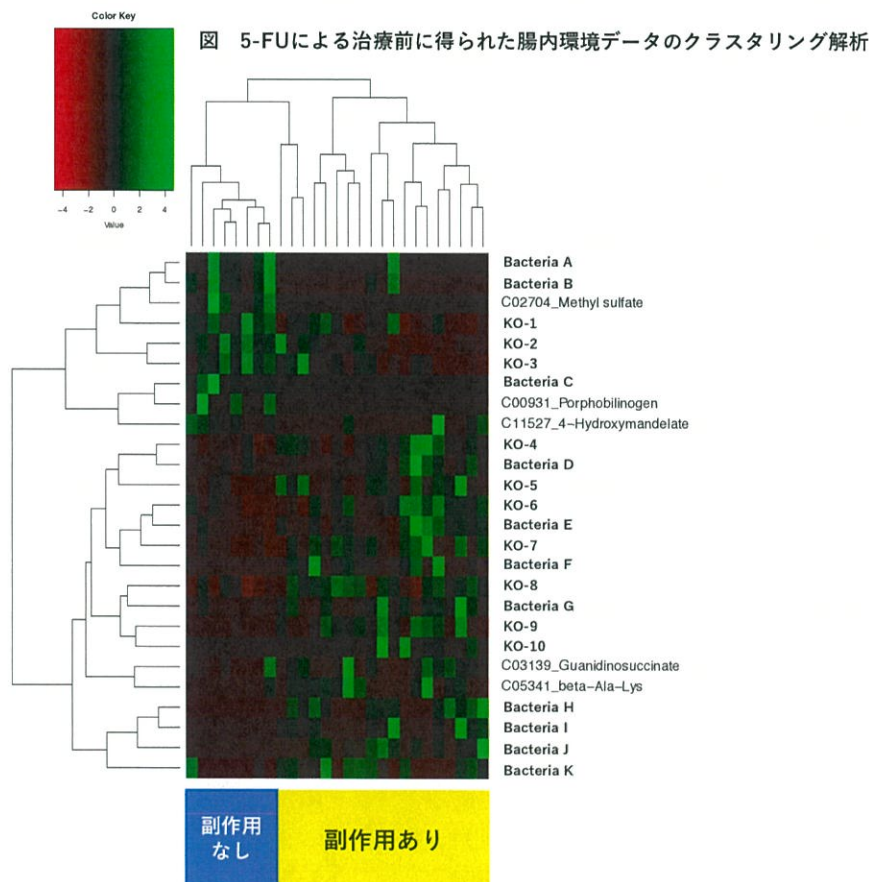
同定された細菌群集の全ゲノム配列から代謝酵素などの機能を予測し、メタボローム解析による代謝物質検出を組み合わせることで、免疫チェックポイント阻害剤の効果と関連する細菌、並びにその代謝経路の同定を目指す。



また、欧米から報告されている免疫チェックポイント阻害剤奏効性関連腸内細菌データ (Routy B, et al. *Science* 2018, Gopalakrishnan V, et al. *Science* 2018, Matson V, et al. *Science* 2018) との比較を行い、人種間で保存されている、あるいは日本人に特徴的なバイオマーカーの探索も行う。

4) 結果 及び 5) 考察

まず先行研究として、5-FU による全身化学療法を行う患者を対象に、副作用発現の有無によって腸内環境データを分類することを目的としてクラスター解析を実施した。5-FU を投与する前に対象患者から便サンプルを採取し、メタゲノム解析及びメタボローム解析を行い、5-FU 治療前の腸内環境データをスクリーニングした。5-FU による全身化学療法を受けた当該患者の臨床情報から、副作用発現の有無を詳細に抽出した。これらのデータを基にクラスター解析を実施したところ、5-FU による副作用があった患者集団と副作用がなかった患者集団とでは、腸内環境が異なる傾向がみられた (下図)。また、副作用がなかった患者群にみられた特定の細菌種は、副作用があった患者群に比べて有意に多く存在することが明らかになった。



さらに免疫チェックポイント阻害剤を使用した患者を対象として、治療前の凍結便を 25 例で収集済みであり、シーケンス解析を 25 例で行い、現在、臨床情報とともに統合的な解析を進めている。

(2) シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

本研究によって、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果及び有害事象の出現を予測する新たなバイオマーカーを同定し、臨床研究による検証を進めることができれば、Microbiome-based immune-precision medicine として、免疫チェックポイント阻害剤を適切に用いるべき患者集団を選定することで患者負担の軽減や医療経済への貢献が期待される。また、治療効果が高く、副作用が少ない症例群の腸内細菌と食生活等との関連を明らかにできれば、治療反応性腸内環境を誘導し、細菌芽胞カプセルなどの新たな創薬への展開も期待される。