



Title	超音波内視鏡下穿刺吸引法で得られた検体を用いた脾腫瘍内細菌叢の検討
Author(s)	中野, 真太郎
Description	配架番号 : 2617
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14496号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14496
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96784
Type	doctoral thesis
File Information	Shintaro_Nakano.pdf



学位論文

超音波内視鏡下穿刺吸引法で得られた検体を用いた

膵腫瘍内細菌叢の検討

(Efficacy of endoscopic ultrasound-guided fine
needle aspiration (EUS-FNA) to evaluate the tumor
bacteria in pancreatic cancer)

2021 年 3 月

北海道大学

中野 真太郎

学位論文

超音波内視鏡下穿刺吸引法で得られた検体を用いた

膵腫瘍内細菌叢の検討

(Efficacy of endoscopic ultrasound-guided fine
needle aspiration (EUS-FNA) to evaluate the tumor
bacteria in pancreatic cancer)

2021 年 3 月

北海道大学

中野 真太郎

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
研究方法	1 1 頁
研究結果	1 7 頁
考察	2 6 頁
結論	3 0 頁
謝辞	3 1 頁
利益相反	3 2 頁
引用文献	3 3 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

Shintaro Nakano, Yasuyuki Kawamoto, Yoshito Komatsu, Rika Saito, Ken Ito, Takahiro Yamamura, Kazuaki Harada, Satoshi Yuki, Kazumichi Kawakubo, Ryo Sugiura, Shin Kato, Koji Hirata, Hajime Hirata, Masahito Nakajima, Ryutaro Furukawa, Yunosuke Takishin, Kousuke Nagai, Isao Yokota, Keisuke H. Ota, Shinji Nakaoka, Masaki Kuwatani, Naoya Sakamoto

Efficacy of EUS-FNA to evaluate the tumor bacteria in pancreatic cancer
雑誌名 : Gut

本研究の一部は以下の学会にて発表予定である。

第 18 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2021 年 2 月 18 日～2 月 21 日 Virtual

Shintaro Nakano, Yasuyuki Kawamoto, Yoshito Komatsu, Kazuaki Harada, Ken Ito, Rika Saito, Takahiro Yamamura, Satoshi Yuki, Masaki Kuwatani, Hajime Hirata, Ryutaro Furukawa, Yunosuke Takishin, Kousuke Nagai, Naoya Sakamoto

Intratumor microbiome analysis of pancreatic cancer with tissues obtained by EUS-FNA

ASCO GI、2021 年 1 月 15 日～1 月 17 日 Virtual

Shintaro Nakano, Yasuyuki Kawamoto, Kazuaki Harada, Ken Ito, Rika Saito, Takahiro Yamamura, Satoshi Yuki, Hajime Hirata, Ryutaro Furukawa, Yunosuke Takishin, Kousuke Nagai, Masaki Kuwatani, Yoshito Komatsu Naoya Sakamoto

Evaluating the intratumor microbiome of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) by analyzing the fresh frozen tissues obtained by endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration (EUS-FNA)

要 旨

【背景と目的】

近年、腸内を代表される細菌叢(フローラ)は消化器疾患のみならず肥満、糖尿病、うつ病、自閉症、喘息、アレルギーなど、多くの疾患との関連性が報告されている。近年、腫瘍組織内に細菌が存在し(腫瘍内フローラ)、がんの発生、進展、転移、治療抵抗性などに関連する可能性が大腸癌や食道癌などで報告されている。膵臓は元来無菌的な臓器とされていたが、近年の報告で膵癌組織には、非膵癌患者の膵臓に比べて多くの細菌が存在していることが示された。また、腫瘍内フローラが膵癌に対する主要な抗腫瘍薬の一つである Gemcitabine を代謝・不活化することや、膵癌術後症例において膵癌フローラの高い多様性が良好な予後に関連すること、特定の細菌の存在が予後に関連する可能性が示された。このように、膵癌における膵癌フローラの重要性が認識されてきているが、過去のヒト検体を用いた研究はほとんどが手術検体によりもたらされてきた。膵臓癌の多くは手術適応のない進行期で発見されるため、進行期膵癌における膵癌フローラの研究を行うためには手術以外の方法で検体を採取する必要がある。EUS-FNA (endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration) は膵癌の病理診断を行うために組織検体を得る標準的な手技であるが、EUS-FNA で得られた膵癌検体を用いた膵癌フローラ解析の既報はない。そこで、我々は、膵癌において病理診断目的に行う EUS-FNA にて得られた検体を用いて膵癌フローラの検出可能性、および膵癌フローラの多様性、特徴を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

北海道大学病院にて2019年5月から2020年4月に膵癌が疑われた30名の患者を対象として、膵癌検体をEUS-FNAにて採取、胃粘膜、十二指腸粘膜を内視鏡鉗子生検を用いて採取した。採取した検体に対して16S リボソーム RNA(16S rRNA)解析を行い、膵癌 EUS-FNA 検体からのフローラ解析の可能性について検討した。続いて、膵癌および背景消化管のフローラとの比較、切除可能膵癌と切除不能膵癌の膵癌フローラの比較検討などを行った。

【結果】

膵癌 FNA 検体は30名中24名(80%)、胃粘膜は30名(100%)、十二指腸粘膜は29名(97%)でメタゲノム解析のためのシーケンスが可能であった。膵癌で解析可能であった症例と解析不可能症例について臨床的因子に有意な偏りは認めなかったが、体尾部癌($p=0.15$)、胃からの穿刺($p=0.18$)、制酸薬の使用($p=0.18$)が解析不可能例に多い傾向であった。多様性については、 α 多様性(Shannon index、Observed features)は膵癌が胃・十二指腸に比べて有意に低い傾向であった。 β

多様性では主座標分析を行い、unweighted UniFrac distance、weighted UniFrac distance で腭癌は胃、十二指腸と有意差を認めた。系統分析では、門レベルの組成で腭癌は胃・十二指腸に比べて *Proteobacteria* 門が優位に多い一方で、*Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門は有意に少ない傾向であった。以上の結果から、腭癌フローラは胃・十二指腸フローラと比べて多様性や組成が異なる集団であることが明らかとなった。Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) にて属レベルで特徴的な細菌の解析を行い、腭癌では胃・十二指腸に比べて *Acinetobacter* 属、*Pseudomonas* 属を多く認めた。サブグループ解析として、切除可能腭癌と切除不能腭癌のフローラを比較検討した。腭癌フローラは、切除可能腭癌、切除不能腭癌において α 多様性、 β 多様性で有意差を認めず、門レベルで主要な細菌 (*Proteobacteria*、*Firmicutes*、*Bacteroidota*、*Actinobacteria*) の組成比に有意差を認めず、進行の程度により大きな変化は認めなかった。LEfSe では、切除可能腭癌で *Delftia* 属を多く認めていた。切除不能腭癌で有意に増加している細菌は認めなかった。また、胃・十二指腸フローラは切除可能腭癌に比べて切除不能進行腭癌で α 多様性が低下傾向であった。EUS-FNA 穿刺部位による腭癌フローラの組成は、主要な門レベルで有意差を認めなかった。

【考察】

本研究で、EUS-FNA で採取した腭癌検体を用いた腭癌フローラの 16S rRNA 解析が多くの症例で可能であることが明らかになった。従って、EUS-FNA 検体を用いることで手術不能進行腭癌のフローラについても解析が可能であった。本研究では腭癌フローラ検出率の低下に有意に関連する因子を認めなかったが、腭癌体尾部癌、胃からの穿刺、制酸薬の使用例で検出率が低い傾向であった。腭癌フローラは十二指腸乳頭から侵入すると考えられており、体尾部癌には細菌が到達しにくい可能性がある。また、制酸薬は腸内フローラに影響するため、十二指腸フローラへの影響を介して腭癌フローラの形成にも関連する可能性がある。腭癌フローラの組成については、*Proteobacteria* 門、*Gammaproteobacteria* 網が多いことが複数の研究で示されているが、本研究では *Proteobacteria* 門を多く認め、下位レベルの分類では *Acinetobacter* 属、*Pseudomonas* 属など *Gammaproteobacteria* 網に属する細菌を多く認めており、既報に矛盾しない結果であった。また、本研究は早期腭癌 (Resectable 腭癌)、進行腭癌 (Unresectable 腭癌) とともに含んでおり、サブグループ解析として、進行腭癌の腭癌フローラについて多数例による解析を初めて行った。腭癌フローラの進行期による違いを検討すると、腭癌は進行期によって α 多様性、 β 多様性は有意差なく、門レベルでも主要な門の組成に有意な偏りを認めなかったが、早期腭癌においては、*Delftia* 属が多い傾向があった。既報では腭癌患者と対照患者の十二指腸フロー

ラを比較したところ、膵癌患者の十二指腸で *Delftia* 属を多く認めており、膵癌の発生・早期の進展に関連する可能性がある。また、進行膵癌では背景消化管の多様性が低下していることが示唆された。進行膵癌では経口摂取不良、それによる食習慣の変更などを背景に消化管のフローラが乱れ *dysbiosis* が生じている可能性がある。その臨床的な意義は不明だが、前述の如く膵癌フローラは消化管由来と思われるため、膵癌フローラとの関連性や臨床的アウトカムに関連する可能性がある。本研究の Limitation として、EUS-FNA は胃または十二指腸の壁を貫いて深部臓器である膵臓内の膵腫瘍を生検する手技であり、胃または十二指腸のフローラがコンタミネーションする可能性が否定できなかった。我々の結果では、①膵癌フローラは胃、十二指腸フローラと比べて多様性が異なり、フローラの集団として異なること、また門レベルの組成において膵癌フローラと胃・十二指腸フローラは大きな偏りがあること、②本研究で得られた膵癌フローラは *Proteobacteria* 門が優位であり既報と比べて矛盾がない結果であったこと、③穿刺部位が胃および十二指腸からであっても門レベルでフローラに偏りを認めなかったことから、EUS-FNA 検体で得られた検体からの膵癌フローラの解析結果には大きなコンタミネーションはなく、信頼できる解析結果であると判断した。

【結論】

本研究では、EUS-FNA で得られた検体を用いて膵癌フローラの解析が可能であることを明らかにした。膵癌フローラは胃や十二指腸など背景となる消化管のフローラと比べて多様性や組成が異なる集団であることが分かった。また、本研究より、EUS-FNA を用いれば、手術不能進行膵癌の膵癌フローラ解析も可能であり、早期膵癌と進行膵癌ではフローラに大きな違いはないが、わずかに偏りがある可能性が示された。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである

ALT	alanine aminotransferase
ALP	alkaline phosphatase
Alb	albumin
AST	aspartate aminotransferase
BR	borderline resectable
BSC	best supportive care
CA19-9	carbohydrate antigen 19-9
CDD	cytidine deaminase
CEA	carcinoembryonic antigen
CRT	chemoradiotherapy
CTX	chemotherapy
DNA	deoxyribonucleic acid
DU	duodenum
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EUS-FNA	endoscopic ultrasound-fine needle aspiration
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
ICI	immune checkpoint inhibitor
LefSe	linear discriminant analysis effect size
LDA	linear discriminant analysis
NML	normal
PC	pancreatic cancer
PDA	pancreatic adenocarcinoma
PS	performance status
RE	resectable
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
RNA	ribonucleic acid
ST	stomach
T.bil	total bilirubin
UR	unresectable

【緒言】

(1) 膵癌の疫学

膵臓癌（以下膵癌）は世界で患者数が増加傾向であり、2018 年のがん関連死亡数は 7 位である (International Agency for Research on Cancer)。また、2030 年には、米国におけるがん関連死亡数の第 2 位になると推測されている。本邦において死亡数は肺癌、大腸癌、胃癌に次いで第 4 位 (2016 年) である。本邦においても膵癌は増加傾向であり 2006 年には 22336 人/年であったが 2016 年には 33475 人となり、2020 年には死亡数 36700 人になると予測されている (人口動態統計)。膵癌は 80%以上が進行期で診断され (Society., 2020)、現在の標準治療である FOLFIRINOX 療法と Gemcitabine+nab-paclitaxel 療法を用いても生存期間中央値 8-13 ヶ月程度 (Conroy et al., 2011; Von Hoff et al., 2013) と予後不良である。また、手術が可能な症例であっても 5 年生存率は 25%程度であり (Geer and Brennan, 1993; Yeo et al., 1995)、早期診断に加えて治療法の進歩が望まれている。

(2) 細菌叢（フローラ）とヒト疾患

ヒトの体内には 1000 種類、100 兆個もの細菌が共生していると推定されており、宿主であるヒト細胞よりも多い。環境中に非常に多様な細菌が存在していることを花畑に例えて、細菌叢は「フローラ」とも呼ばれている。細菌は歴史的にはヒトに害を与える疾患の原因（病原微生物）として認識され、もっぱら治療・駆除の対象と考えられてきたが、近年になりフローラがヒトの恒常性に関わる「忘れられた臓器」として注目されるようになった (O' Hara and Shanahan, 2006)。細菌はヒトの皮膚、上気道、口腔から肛門までの消化管など、様々な部位に存在しているが、大部分は大腸に存在している。ヒトには 22 門程度の細菌が存在するが、その 99%は Firmicutes、Bacteroidetes、Proteobacteria、Actinobacteria の 4 門に含まれる細菌である (服部, 2014)。腸内細菌叢は宿主であるヒトが摂取した食事のうち食物繊維などヒトが自らの酵素では難消化性のものを分解して短鎖脂肪酸などの代謝物を産生し、エネルギー源として提供するだけでなく、微生物由来の代謝産物が消化管だけではなく遠隔臓器に作用し、脂肪・糖代謝や免疫系や神経系の機能に影響を与えることが報告されている (Jandhyala et al., 2015; Tripathi et al., 2018)。腸内フローラは機能性ディスペプシア、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患などの消化器疾患に限らず、アトピー性皮膚炎や喘息、1 型糖尿病、肥満、精神疾患など多くの疾患との関連性が注目されている (Cani, 2018; Schroeder and

Backhed, 2016)。

(3) フローラと悪性腫瘍

悪性腫瘍に関しては、細菌との直接的な関係は薄いとされてきたが、局所のバリア機構や代謝免疫系の修飾を介して、癌の発生、進行・転移(Roy and Trinchieri, 2017)との関連性が報告されている。また、腸内フローラは悪性腫瘍に対する治療効果との関連性が報告されている。基礎実験では白金製剤であるオキサリプラチンや、アルキル化剤であるシクロフォスファミドなど殺細胞性抗癌剤の有効性に関連するとの報告がある(Iida et al., 2013)。また、抗生剤使用歴が大腸癌におけるオキサリプラチン併用化学療法の良い効果に関連していたとの報告がある(Imai et al., 2020)。また、腸内フローラと免疫チェックポイント阻害薬(immune checkpoint inhibitor:ICI)の有効性について検討した報告では、非小細胞肺癌(Routy et al., 2018)、悪性黒色腫(Gopalakrishnan et al., 2018; Matson et al., 2018)、腎細胞癌(Routy et al., 2018)において、ICIの奏効と腸内細菌叢の多様性との関連が示され(Routy et al., 2018)、また、報告により異なるが *A. muciniphila* (Routy et al., 2018)、*Bifidobacterium longum* (Matson et al., 2018)、*Collinsella aerofaciens* (Matson et al., 2018)、*Enterococcus Faecium* (Matson et al., 2018)、*Ruminococcaceae family* (Gopalakrishnan et al., 2018) など特定の菌種を認める症例と奏効例の相関が報告されており、ICIの有効性と腸内細菌の関連性が示唆されている。

(4) 腫瘍内フローラと悪性腫瘍

更に最近では、「腫瘍内」フローラが注目されている。*Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) は大腸癌の発生との関連が知られていたが(Kostic et al., 2012)、腫瘍組織内に *F. nucleatum* を多く認めると手術後(Yamaoka et al., 2018)、化学放射線療法後(Serna et al., 2020)の予後が不良であるとの報告がある。また、食道癌でも腫瘍内の *F. nucleatum* の存在は予後不良因子であった(Yamamura et al., 2016)と報告がされており、癌腫によっては腫瘍内フローラと臨床アウトカムの関連性が報告されている(図1)

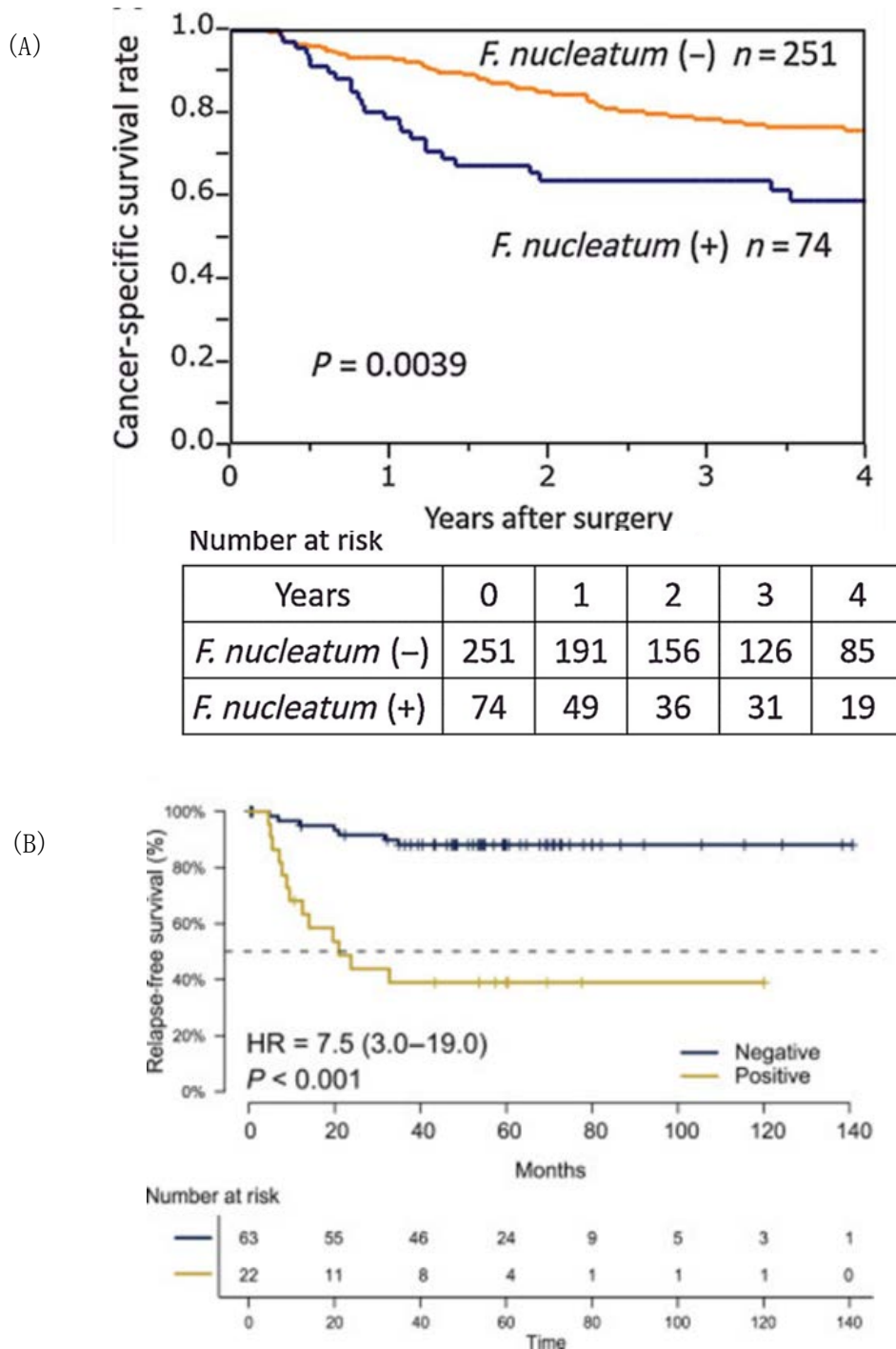


図 1：腫瘍組織内 *F. nucleatum* の存在と悪性腫瘍の予後
大腸癌 (A) と食道癌 (B) において腫瘍組織内の *F. nucleatum* の存在は予後不良因子となる。

(Serna et al., 2020; Yamamura et al., 2016 より引用)

また、最近では、腫瘍には原発組織ごとに異なる細菌が存在すること、卵巣

や脳といった無菌的な臓器の腫瘍からも検出されること、乳癌では分子サブタイプによって検出される細菌が異なること、腫瘍内細菌は腫瘍細胞の内部に存在し得ることが報告されている (Nejman et al., 2020)。膵臓は元来、無菌的臓器と考えられていたが (Wang et al., 2019)、膵癌組織は非腫瘍性の膵組織に比べて多くの腫瘍内細菌 (膵癌フローラ) を認めることが分かってきた (Geller et al., 2017; Noticewala et al., 2020)。(図 2)

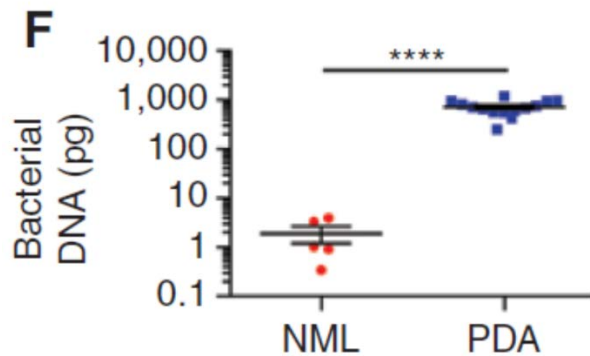


図 2：膵癌と正常膵における膵臓内細菌の比較

膵癌組織は正常膵に比べて細菌を多く検出する (Geller et al., 2017 より引用)

NML : normal、PDA : pancreatic adenocarcinoma

膵癌フローラは *Proteobacteria* 門を多く含むことが特徴的であり (Geller et al., 2017; Nejman et al., 2020; Pushalkar et al., 2018) (図 3)、腫瘍免疫に免疫寛容をもたらすことで膵臓癌の進展に関わっていると報告されている (Pushalkar et al., 2018)。

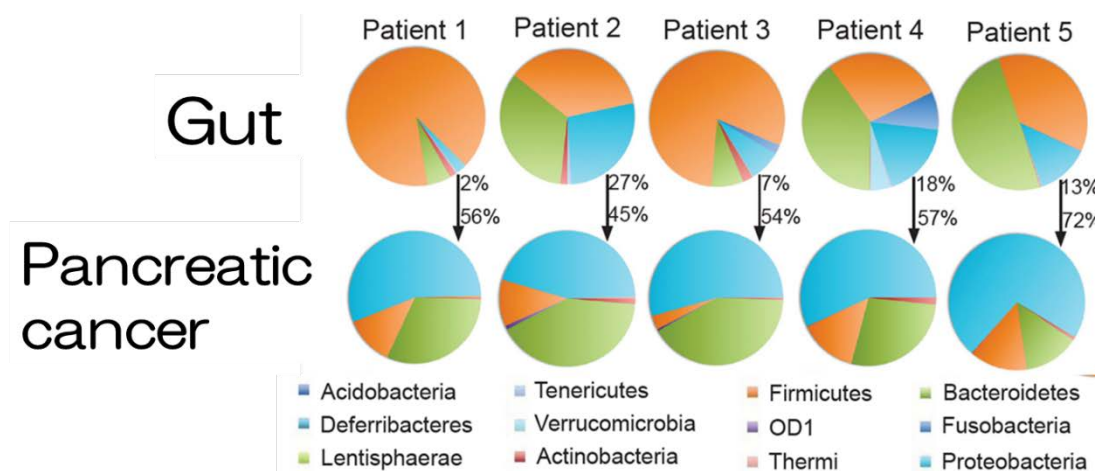


図 3：腸内フローラと膵癌フローラの比較

膵癌フローラは *Proteobacteria* 門を多く含む (Pushalkar et al., 2018 より引用改変)

また、膵癌フローラに多く認める *Gamma*proteobacteria 網の一部の細菌は、膵癌のキードラッグである Gemcitabine を自身が保有するシチジンデアミナーゼ (Cytidine deaminase:CDD) の long isoform (CDD_L) で不活化することにより、Gemcitabine の治療抵抗性に関連し得る (Geller et al., 2017) ことが報告されている。さらに、膵癌術後症例において、切除検体の膵癌フローラの多様性が高い方が予後良好であり、特定の細菌の存在と良好な予後が優位に関連しており、免疫学的な機序が推測されている (Riquelme et al., 2019) (図 4)。

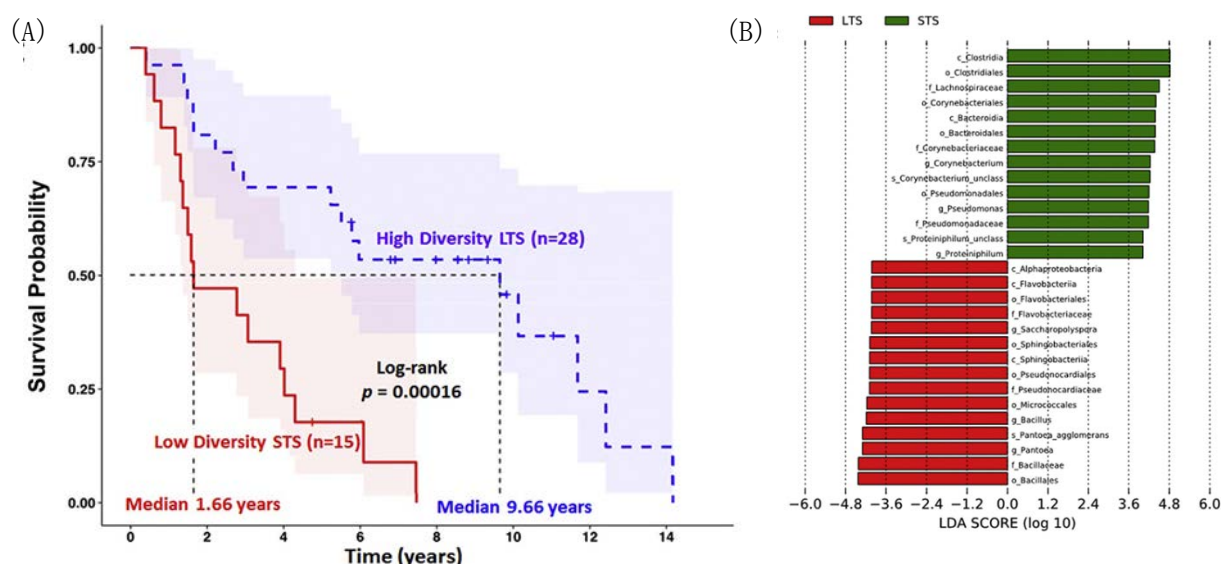


図 4：膵癌術後患者の予後と膵癌フローラの多様性、細菌種の関連

(A) 膵癌フローラの多様性が高い群で予後良好である、(B) 長期生存・短期生存群で細菌叢に差異を認める (Riquelme et al., 2019 より引用)

以上より、既報から膵癌フローラは膵癌の進行において重要な役割を果たしており、また膵癌フローラを改変することで手術や化学療法の効果を改善できる可能性も示唆されている。しかしながら、膵癌フローラに関する研究の問題点として、既報では膵癌フローラの研究に手術検体を用いていることが挙げられる。膵癌の多くは切除不能進行癌のため手術検体を入手することが困難であり、既報では進行膵癌は膵癌フローラ解析の対象に入っていない。また、切除可能膵癌に対して近年は術前補助化学療法を行うことが増加しており、本邦では主に Gemcitabine+S-1 療法 (Unno et al., 2019) が用いられる。Gemcitabine は前述の如く膵癌フローラと治療効果の関連が示唆されており、治療開始前の膵癌フローラが化学療法の選択に寄与する可能性がある。日常診療では超音波

内視鏡下針生検(endoscopic ultrasound-fine needle aspiration: EUS-FNA)により膵腫瘍を穿刺し、採取された生検検体を用いて組織病理学的証拠を得ることにより、その後の手術療法、化学療法などの治療選択を行っている。EUS-FNA で得られる検体は微量だが、膵癌、胆道癌、肺癌などで次世代シーケンサーによる遺伝子解析が可能であると報告されている(Hirata et al., 2019; Kameta et al., 2016; Reynolds et al., 2017)。また、近年は新しい穿刺針の登場により、良質な検体を多く得られるようになってきた(Hucl et al., 2013)。このように、EUS-FNA は術前の切除可能(Resectable)膵癌および切除可能境界(Borderline resectable)膵癌、また切除不能(Unresectable)膵癌から検体を得る現実的な選択肢であり、かつ遺伝子解析と同様にフローラの解析もできる可能性があるが、現在のところ EUS-FNA 検体から膵癌フローラを検出できるか否かを検討した研究は報告されていない。

本研究では、膵癌患者から得られる EUS-FNA 検体を用いてフローラ解析が可能であるか、また、膵癌フローラの特徴や消化管フローラとの関連性を検討することを目的とした。

【研究方法】

1. 対象患者

2019 年 5 月から 2020 年 4 月までに北海道大学病院消化器内科に通院または入院中の膵臓癌（膵管癌: pancreatic ductal adenocarcinoma）が疑われている患者を対象とし、(1) 選択基準をすべて満たし、かつ (2) 除外基準のいずれにも該当しない場合を適格とした。

(1) 選択基準

<仮登録>

- ①年齢が 20 歳以上の者
- ②各種画像検査で膵腫瘍が疑われ、EUS-FNA による診断を必要とする者
- ③本研究への参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理解の上、研究対象者本人の自由意思による同意が得られた者

<本登録>

EUS-FNA による病理学的診断により、膵管癌と診断された者

(2) 除外基準

- ①嚢胞性腫瘍(充実性領域を認めず EUS-FNA が困難なもの)
- ②EUS-FNA 時に出血傾向を有する者
 - PT-INR $\geq$ 1.5
 - 血小板数 <5 万/mm²
 - 抗血小板薬ないし抗凝固薬を内服中であり、休薬が不可能である者
(血栓症リスクの高危険群で、アスピリンまたはシロスタゾールいずれかの服用継続が必要な者は許容する(日本内視鏡学会, 2012))
- ③原病以外の他臓器に重篤な合併症を有する症例・・・ASA 分類 3 以上
- ④ECOG-Performance Status(PS) 3 以上
- ⑤重度の心疾患もしくは肺疾患を有する者
- ⑥妊婦、授乳婦あるいは妊娠している可能性がある者
- ⑦膵腫瘍に対して化学療法、放射線療法の既往がある者
- ⑧EUS-FNA 採取検体による組織学的検査で膵管癌の診断とならなかった症例
- ⑨その他、研究責任者または研究分担者が研究対象者として不適当と判断した者

本研究は、北海道大学病院倫理委員会の承認を得て行われ（自-018-0271）、

全ての対象患者に 1964 年ヘルシンキ宣言に拠るヒトを対象とする医学研究の倫理原則に基づきインフォームドコンセントを行い、書面での同意を得た。

2. 研究の方法

(1) 研究の種類・デザイン 前向き観察研究

(2) 観察および検査項目とその実施方法

以下の項目について、研究対象者の診療録から情報を入手し利用する。①から③については EUS-FNA 前および後の情報とし、④については膵臓癌治療開始後の情報とする。これらはすべて日常診療で実施される項目であり、その頻度も日常診療と同等である。

- ① 対象者基本情報：年齢、性別、臨床病期 (UICC7 版に準拠)、Performance status、原発部位、転移臓器、腹部手術歴、1 カ月以内の抗生剤使用歴
- ② 血液検査所見 (血液学的検査 (白血球数、好中球数、ヘモグロビン、血小板数)、血液生化学的検査 (AST、ALT、T-Bil、ALP、血清クレアチニン、ナトリウム、カリウム、C 反応性タンパク)、腫瘍マーカー (CEA、CA19-9))
- ③ 画像検査 (主に CT 検査、必要に応じて MRI、PET-CT 検査も参照する)
- ④ EUS-FNA 検体の病理学的所見 (組織型、分化度、免疫組織化学的所見など)
- ⑤ 治療情報 (手術であれば手術日、術後 Stage、術後補助化学療法、無再発生存期間など、放射線療法であれば放射線照射量、部位、併用化学療法の有無、化学療法であればレジメン、無増悪生存期間、全生存期間、奏効率、有害事象など)

		観察期間 (12 カ月)					
期間	検査前	検査日	翌日	3 カ月	6 カ月	9 カ月	12 ヶ月
同意	○						
患者背景	○						
EUS-FNA		○					
血液生化学検査	○		○				
治療情報				●	●	●	●

○：実施 (必須項目)

●：12 週毎（±28 日許容）に実施

(3) 利用する試料および採取方法

北海道大学病院消化器内科で膵腫瘍の病理診断目的に EUS-FNA（下記参照）を施行し得られた検体を使用する。下記の方法で EUS-FNA を施行し検体を得る。その後、胃内走査で胃粘膜、十二指腸走査で十二指腸粘膜を、生検鉗子を用いて生検し検体を得る。得られた検体（胃粘膜、十二指腸粘膜、FNA 検体）は採取後速やかに-80℃液体窒素にて保存し、北海道大学大学院医学研究院消化器内科学教室の冷凍庫にて冷凍保存する。検体は解析時に北海道大学からデータ解析施設に冷凍状態にて輸送する。

1) EUS-FNA の方法

経口的に超音波内視鏡（UCT-260 or UCT-240, Olympus medical systems 社製）を挿入し、経消化管的（胃、十二指腸）に標的病変を描出し、EUS-FNA 穿刺針を用いて標的病変を穿刺する。EUS-FNA 穿刺針の種類は本試験では特に規定せず、術者判断で状況に合わせて選択する。得られた検体は生理食塩水を用いてスライドグラス上で穿刺針外に押し出し、白色検体の有無を確認する。原則として検体の一部を用いて迅速細胞診を行い、目的とした検体が採取できたかを確認する。確認が取れた場合には、その白色検体のすべてを保存用のチューブに入れてすみやかに液体窒素に保存する。確認が取れない場合には、追加穿刺を行う。

2) 測定項目

採取検体より核酸抽出を行い 16S リボソーム RNA（rRNA）領域プライマー設計及び PCR 増幅によるライブラリーを作成する。次世代シーケンサーを用いて配列解析を行う。上記はタカラバイオ株式会社にて行う。

3) 発送

検体を匿名化した上で冷凍状態にてデータ測定施設（タカラバイオ株式会社）に発送する。具体的な発送時期は研究事務局が決定する。

(4) 研究対象者の研究参加予定期間

研究対象者は同意後、検体採取日（検査日）から 12 カ月の期間で参加する。

(5) 研究終了後の対応

本研究終了後は、本研究の成果を関連学会等において発表し、英文誌に投稿

し公表する。

3. FNA 検体、胃、十二指腸粘膜 16S rRNA 解析

①ライブラリー作製とシーケンシング方法

下記1-6は、タカラバイオ株式会社にて施行された。

1. DNA抽出

NucleoSpin Soil(マッハライ・ナーゲル社)を用いてゲノム DNA を調整した。

2. DNA溶液の定量測定

Quant-iT dsDNA Assay Kit(Invitrogen)を用いて、抽出したDNA溶液の二本鎖DNA定量を行った。

3. DNA溶液の精製

ゲノムDNAの品質向上をみるため、AMPureXP (ベックマン・コールター社) を使用して精製処理を行った。

4. ライブラリー作製

2 step tailedPCR法を用いてライブラリーを作製した。

5. ライブラリーの品質確認

Agilent TapeStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)を用いて、作製したライブラリーの品質確認を行った。

6. シーケンシング解析

MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いて 2x300bp の条件でシーケンシングを行った。

②データ解析方法

シーケンスにより得られた全検体のfastq(タグ分類後)をもとにOTU構築を行った。

・fastqファイルをQIIME2(Bolyen et al., 2019)にインポートし、データのqualityを確認した。Quality scoreがForward read、Reverse readともに240

塩基まで高い30以上と高いqualityを維持していることを確認した。

- ・ QIIME2に実装されているquality control toolであるDADA2を用いてqualityの低い塩基、キメラ配列、プライマー配列を除外した。
- ・ 代表配列のマルチプルアラインメントを行い系統樹を作成した。
- ・ 系統樹ファイルを用いて α 多様性、 β 多様性解析を行った。
- ・ silvaをデータベースとして分類器を作成し、フローラ組成の算出を行った。
- ・ フローラ組成ファイルを用いてLinear discriminant analysis effect size (LEfSe) を施行した。

4. 評価項目（エンドポイント）

（1）主要評価項目

EUS-FNA 検体を用いた膵癌フローラの検出割合

（2）副次的評価項目

- ・ 膵腫瘍内細菌の種類、分布
- ・ 胃粘膜、十二指腸粘膜のフローラの種類、分布

（3）コンタミネーションの検討

FNA 検体と胃、十二指腸検体のフローラの比較について、下記条件をすべて満たす場合は contamination の可能性ありと判断する。

①FNA 検体の解析で最も多く含まれる菌が *Proteobacteria* 門でない場合

②FNA 検体の結果と同一症例の FNA 穿刺臓器粘膜(胃または十二指腸)からの結果と検出割合が 1-5 番目の菌が属レベルで一致する場合

（4）統計解析方法

主要評価項目について、採取した検体から細菌の検出が可能であった症例を全

体の症例で除したものを細菌検出割合とした。フローラの評価として、 α 多様性を shannon-index、observed species などの指標を用いて評価した。Kruskal-Wallis 検定を行い、 $p < 0.05$ で有意とした。 β 多様性は unweighted UniFrac distance、weighted UniFrac distance を指標として評価を行った。PERMANOVA 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。Relative abundance については、門レベルのフローラの違いは Kruskal-Wallis 検定、Bonferroni 補正を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。網レベル以下の解析は LEfSe (Segata et al., 2011) を施行した。解析は SPSS ver. 26 (IBM, Armonk, NY, USA) を用いて施行した。

サンプルサイズ設定の根拠

既報では膵癌切除検体の 76% から細菌叢解析が可能であり (Geller et al., 2017)、EUS-FNA 検体を用いた解析では低下すると仮定した。期待値を前述の既報の 90% (67.5%)、閾値を既報の 50% (37.5%) と規定し、二項分布による検定による $\alpha 0.05$ 、検出力 80% として必要なサンプルサイズを算出すると 25 例となり、若干の脱落を考慮して 30 例とした。

補足

多様性 (Diversity) とは、生物群集にさまざまな生物種が共存している様子、またはそれを数量表現した概念を表すもので、生態学で従来使用されていた用語である。菌叢解析においても集団の性質を表す指標として用いられる。

α 多様性・・・ある 一つのサンプルの多様性を表す。すなわちサンプル固有の指標で、値が大きいほど種の多様性が高いことを意味する。Shannon index、Observed features、Simpson index、Chao-1 などの指標が用いられる。

β 多様性・・・ある 二つのサンプルの多様性の相違度を表す。2 点間の距離として表現される指標である。距離が大きくなるほど、二つのサンプルの組成が異なることを意味する。Unweighted UniFrac distance、Weighted UniFrac distance などの指標が用いられる。

【研究結果】

2019 年 4 月より 2020 年 5 月までの期間で、合計で 30 人が研究に登録された。主な臨床学的な背景は表 1 に記載した。このうち膵頭部癌が 19 例、膵体尾部癌が 11 例であった。切除可能または境界膵癌と切除不能膵癌はそれぞれ 15 例であった（以後の解析で境界膵癌は切除可能膵癌に含めた）。直近 1 カ月の抗生剤使用歴のあるものは 1 例のみであった。

表 1：患者背景

		N=30
Sex	male/female	11/19
Age	median (range)	70 (54-86)
PS	0/1	18/12
Primary location	head/body/tail	19/5/6
Resectability	RE or BR/UR	15/15
Drainage stent	present/absent	6/24
Initial treatment	CTX/CRT/Resection/BSC	25/1/1/3
Aspiration	stomach/duodenum	12/18
Diabetes	yes/no	10/20
Use of antacids	yes/no	14/16
Use of antibiotics before one month	yes/no	1/29

Resectability は膵癌取り扱い規約 7 版(日本膵臓癌学会)による。

BR, borderline resectable; BSC, best supportive care; CRT, chemoradiotherapy; CTX, chemotherapy; PS, performance status; RE, resectable; UR, unresectable

30 症例中、膵癌 FNA 検体（以下膵癌と記載）は 24 例（80%）、胃粘膜生検検体（以下胃粘膜と記載）は 30 例（100%）、十二指腸粘膜生検検体（以下十二指腸粘膜と記載）は 29 例(97%)でシークエンスが可能であった。膵癌に関してシークエンスが可能であった 24 例と不可能であった 6 例について臨床的特徴を比較したが、解析可能例と不可能例で有意に異なる因子は認めなかった。しかし

ながら、膵体尾部癌 (p=0.15)、穿刺部位;胃 (p=0.18)、制酸薬の使用がない (p=0.18) 症例において、解析不可能例が多い傾向であった (表 2)

表 2：解析可能例と不可能例の比較

		N=30		
		unsuccessful N=6	successful N=24	P-value
Sex	male/female	2/4	9/15	1.00*
Primary location	head/body and/or tail	2/4	17/7	0.15*
Resectability	RE/UR	3/3	12/12	1.00*
Drainage stent	present/absent	1/5	5/19	1.00*
Aspiration	stomach/duodenum	4/2	8/16	0.18*
Diabetes	yes/no	1/5	9/15	0.63*
Use of antacids	yes/no	1/5	13/11	0.18*

RE, resectable; UR, unresectable; * カイ二乗検定

以下、解析可能であったすべての検体を用いてフローラ解析を行った。まず、 α 多様性について検討したが、Shannon index、Observed features について、膵癌は胃および十二指腸に比べて有意に低値であった (p<0.05, Kruskal-Wallis test) (図 5)。 β 多様性は、unweighted UniFrac distance は膵癌が胃粘膜・十二指腸粘膜と有意に異なっていた (p<0.05, PERMANOVA)。weighted UniFrac distance は、膵癌と十二指腸粘膜は有意に異なったが (p<0.05, PERMANOVA)、膵癌と胃粘膜は有意差を認めなかった。(p=0.051, PERMANOVA) (図 6)

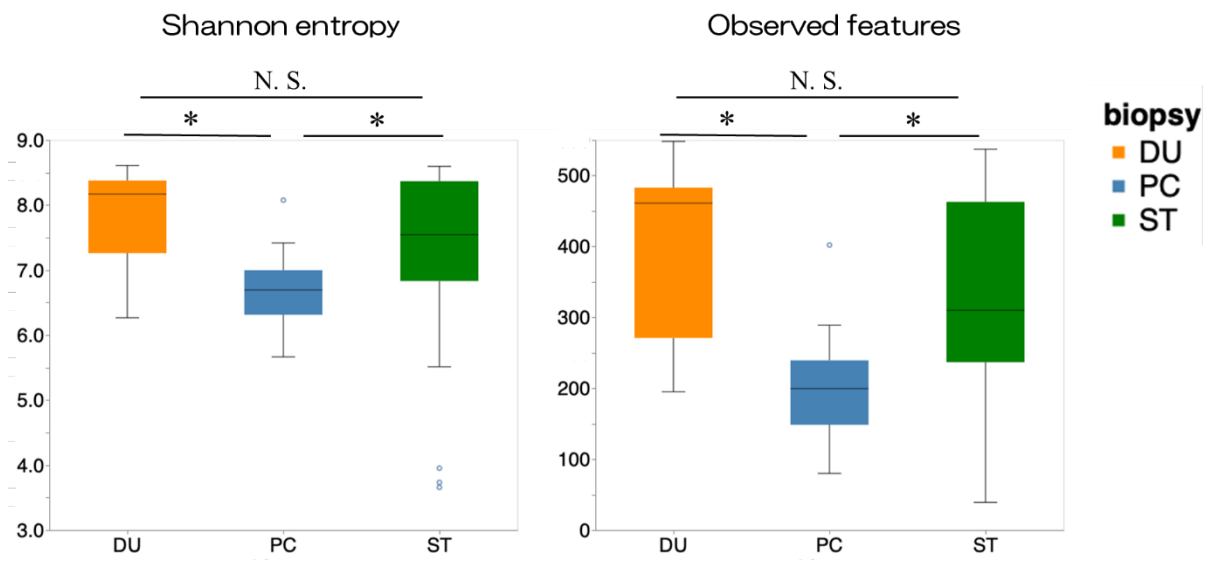


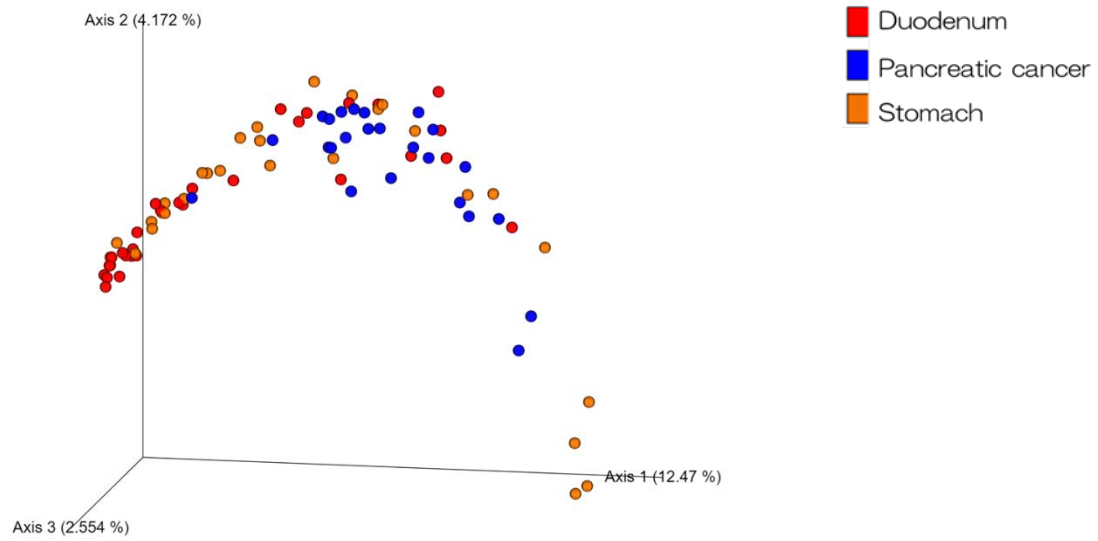
図 5：膵癌、胃、十二指腸フローラの α 多様性

膵癌フローラは胃・十二指腸より有意に α 多様性が低い

DU, duodenum; PC, pancreatic cancer; ST, stomach

*：有意差あり ($p < 0.05$)

(A)



(B)

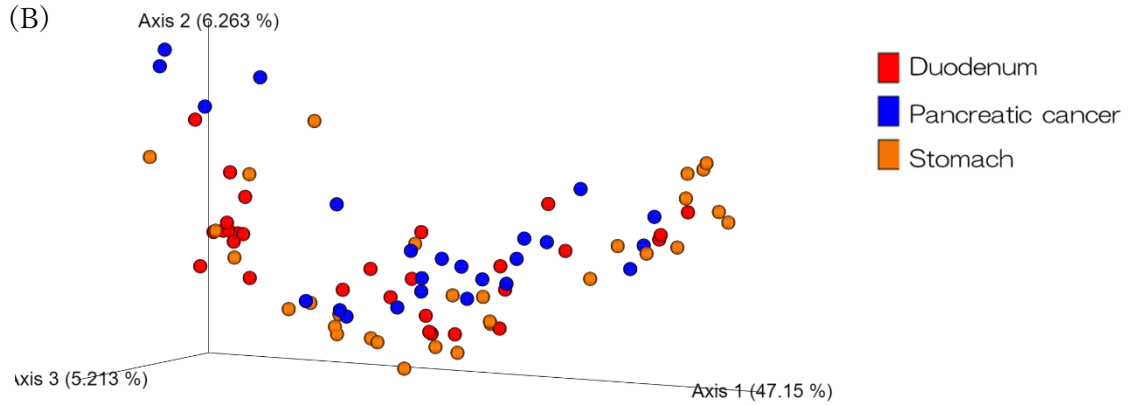
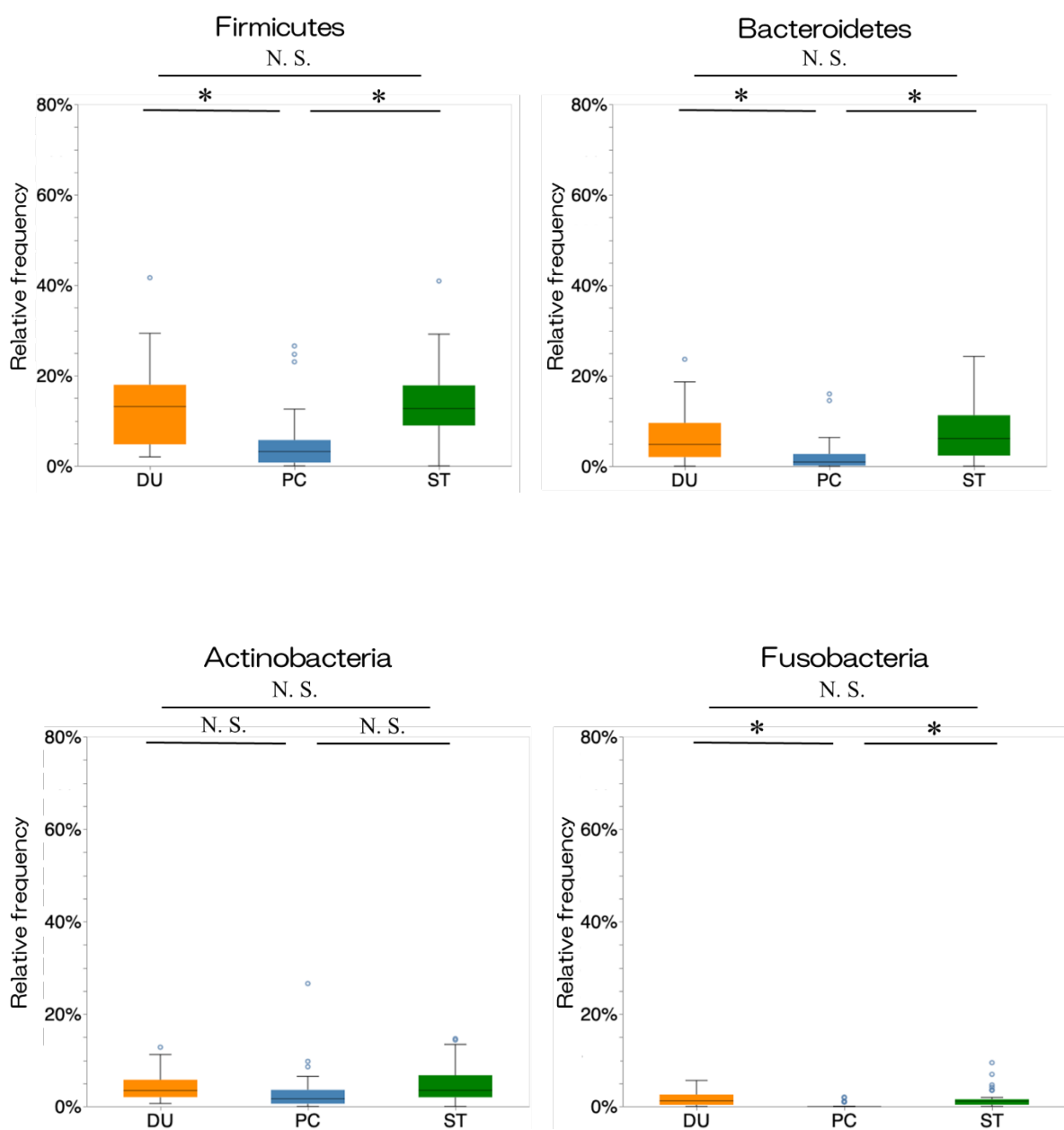


図 6 : 膵癌、胃、十二指腸フローラの β 多様性, (A) Unweighted UniFrac distance, (B) Weighted UniFrac distance

膵癌フローラの β 多様性は胃・十二指腸フローラと有意に異なる

続いて、膵癌、胃粘膜、十二指腸粘膜、各検体の細菌組成を検討した (Kruskal-Wallis test, Bonferoni 補正) (図 7)。門レベルの解析にて、膵癌は胃・十二指腸に比べて *Proteobacteria* 門が有意に多い傾向であり、一方で *Firmicutes* 門、*Bacteroidetes* 門、*Fusobacteria* 門は有意に少ない傾向であった。*Actinobacteria* 門は膵癌と胃・十二指腸群で有意差を認めなかった。



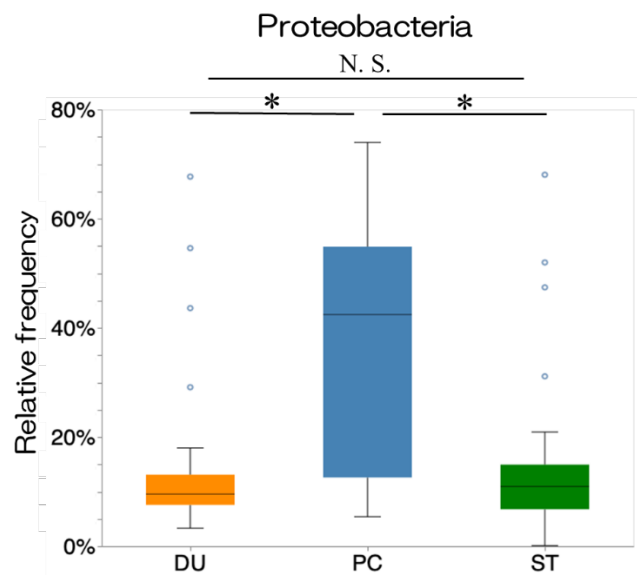


図 7：臓器ごとに比べた門レベルの細菌組成比

膵癌フローラは胃・十二指腸に比べて Proteobacteria 門が有意に多く、また Firmicutes 門、Bacteroidota 門、Fusobacteria 門は有意に少なかった。

Actinobacteria 門は有意差を認めなかった。

DU, duodenum; PC, pancreatic cancer; ST, stomach

*：有意差あり ($p < 0.05$)

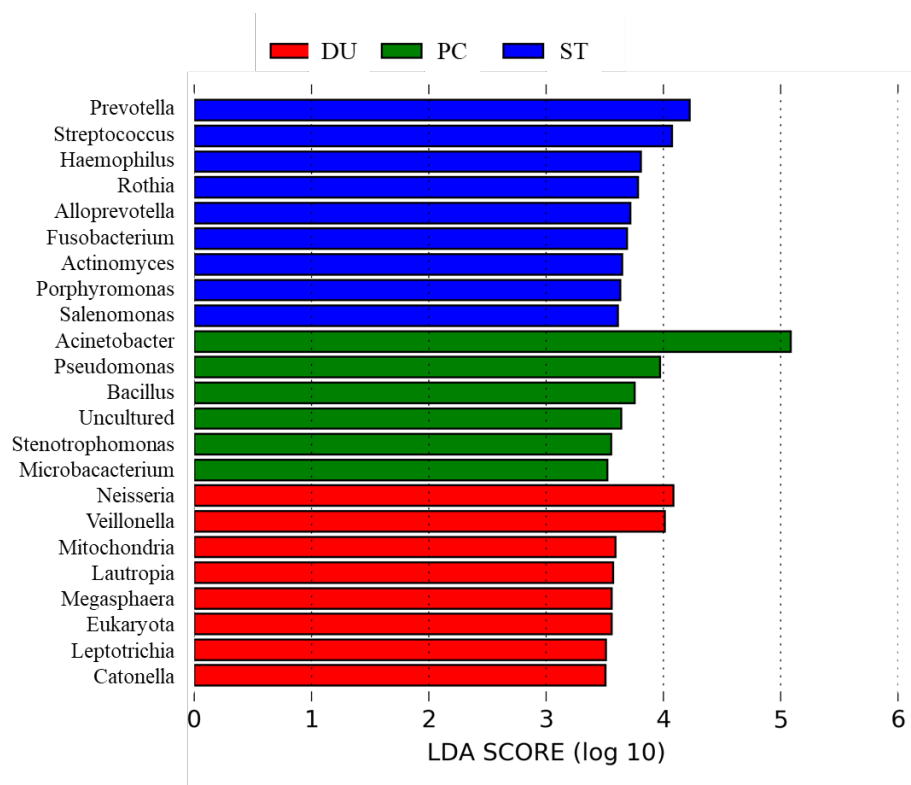


図 8 : LEfSe 解析による生検部位ごとに特徴的な細菌 (属レベル)
 膵癌フローラは *Acinetobacter* 属、*Pseudomonas* 属などを特徴的に認めた。
 DU, duodenum; PC, pancreatic cancer; ST, stomach

次に、より細かい分類レベルにおいて膵癌に特徴的な細菌の検討を行った。LEfSe 解析の結果、属レベルでは膵癌において *Acinetobacter* 属、*Pseudomonas* 属などを有意に多く認めていた (図 8)。胃では *Prevotella* 属、*Streptococcus* 属などを、十二指腸では *Neisseria* 属、*Veillonella* 属などを多く認めた。膵癌で多く認めた細菌の relative abundance を各群で比較、図示した (図 9)。

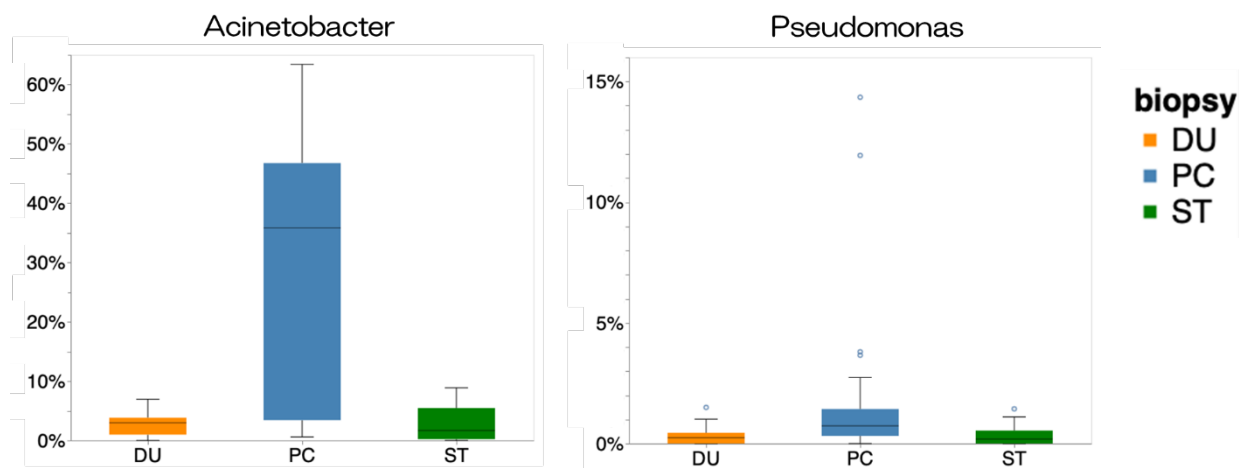


図 9：膵癌で特徴的に認めた細菌の各生検部位ごとの組成比
 Acinetobacter は特に膵癌フローラに多く認めた。
 DU, duodenum; PC, pancreatic cancer; ST, stomach

背景で記載したように、ヒト膵癌フローラに関するほとんどの研究は手術検体を用いて行われており、手術の適応とならない進行膵癌（Unresectable 膵癌）の膵癌フローラに関するまとまった報告はない。そこで本研究ではサブグループ解析として、resectable 膵癌と unresectable 膵癌のフローラの多様性、組成について比較検討した。 α 多様性は Shannon index を比較し、resectable 膵癌と unresectable 膵癌の両群に有意差を認めなかった（図 10）。 β 多様性は unweighted UniFrac distance、weighted UniFrac distance を比較し、ともに両群に有意差を認めなかった（Unweighted UniFrac distance $p=0.072$, Weighted UniFrac distance $p=0.543$ ）（図 11）。背景消化管に関しては、胃の Shannon index が Unresectable 群で有意に低下し（ $p<0.05$, Mann-Whitney U Test）、十二指腸では有意差はないものの Unresectable 群で低下傾向であった（ $p=0.106$, Mann-Whitney U Test）。

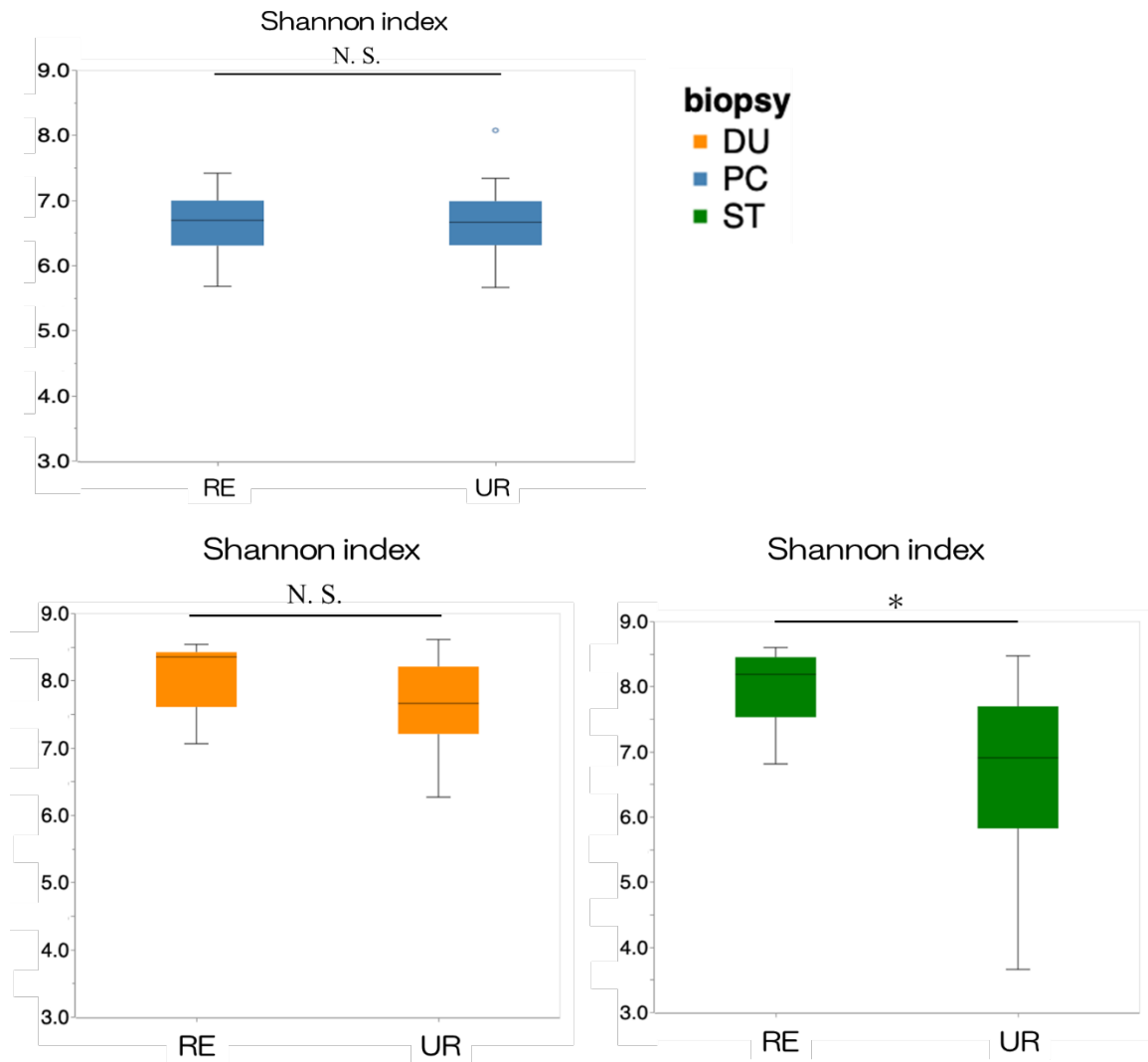


図 10 : Resectable 群と Unresectable 群の α 多様性 (生検部位ごと)
 膵癌フローラでは有意差はないが、胃は Unresectable 群で有意に低下し、十二指腸でも低下傾向であった。
 DU, duodenum; PC, pancreatic cancer; RE, resectable; ST, stomach;
 UR, unresectable

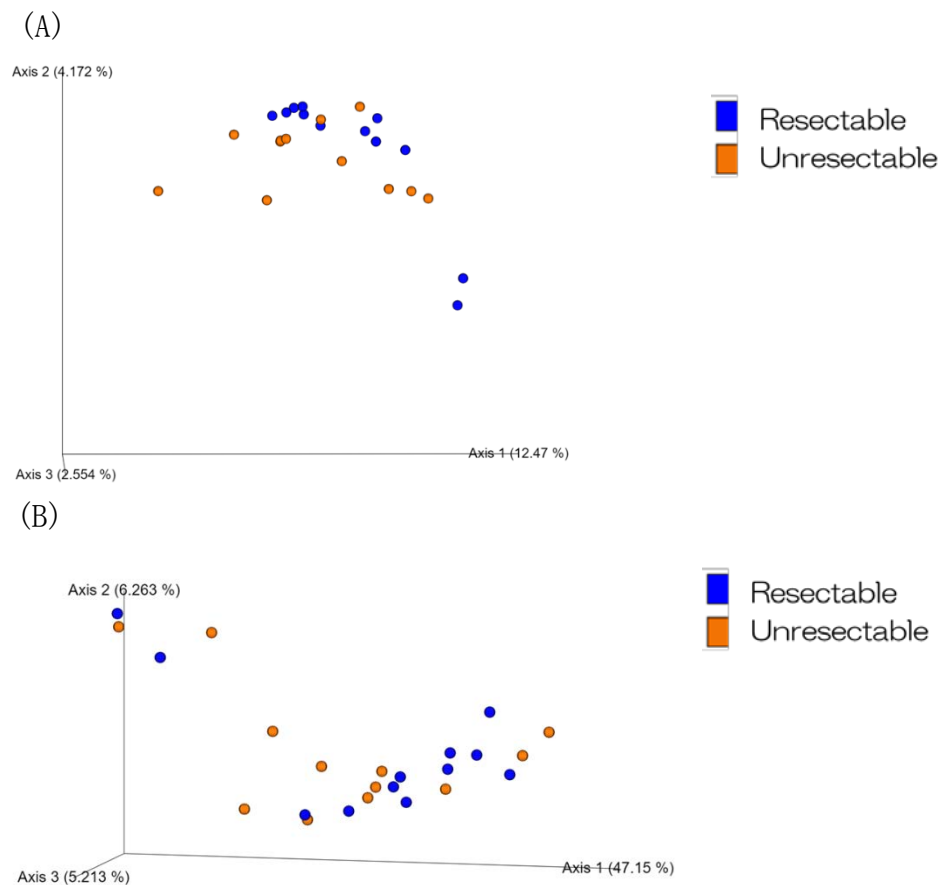
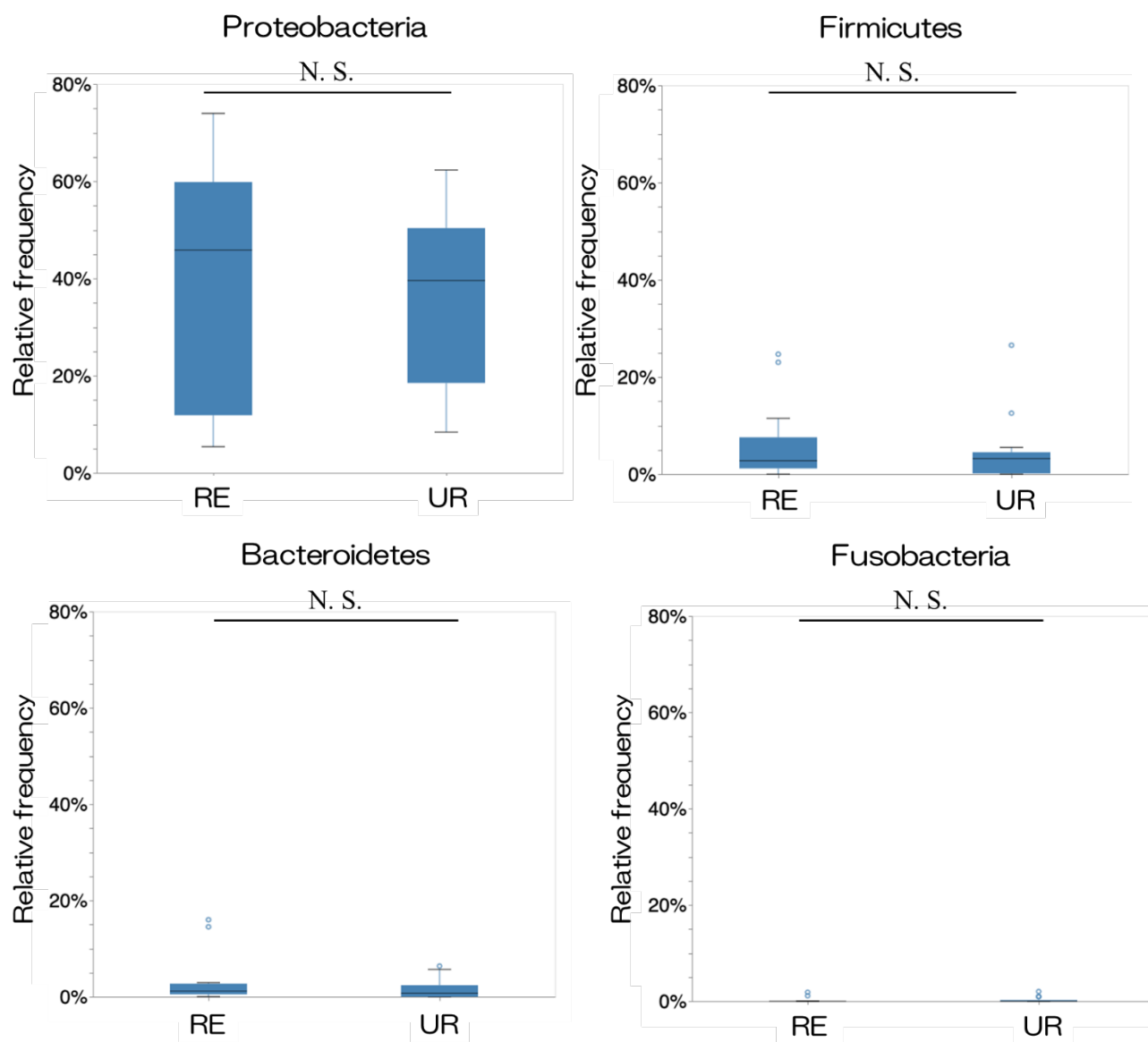


図 11 : Resectable 膵癌と Unresectable 膵癌の β 多様性
 (A) Unweighted UniFrac distance, (B) Weighted UniFrac distance
 Resectable 膵癌と Unresectable 膵癌では β 多様性に有意差を認めなかった。

続いて、各群の膀胱癌フローラの組成について比較検討を行った。門レベルの組成については、主要な門 (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*) において、両群で有意差を認めなかった (図 12)。



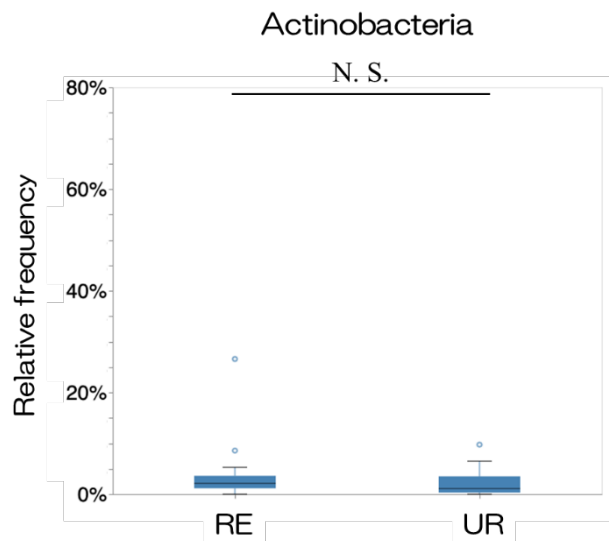


図 12 : Resectable 膵癌と Unresectable 膵癌における主要な細菌の比較（門レベル）

Resectable 膵癌と Unresectable 膵癌では主要な細菌（門レベル）において有意差を認めなかった。

RE, resectable; UR, unresectable

次に、より下位レベルの比較を LEfSe にて解析すると Resectable 膵癌は Unresectable 膵癌に比べて *Delftia* 属を有意に多く検出していた（図 13）。Unresectable 群で有意に増加していた細菌は認めなかった。

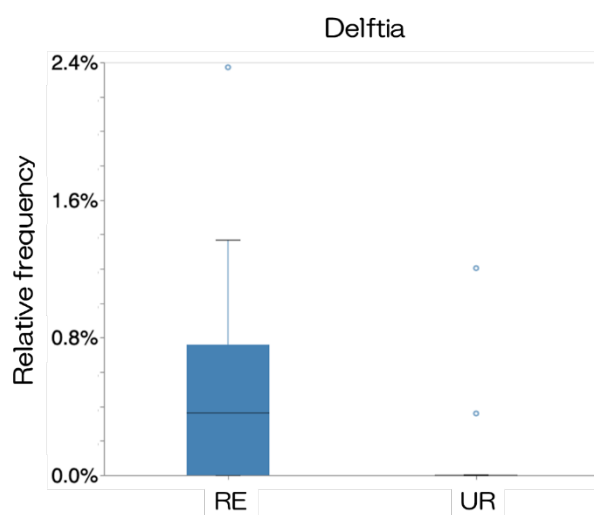
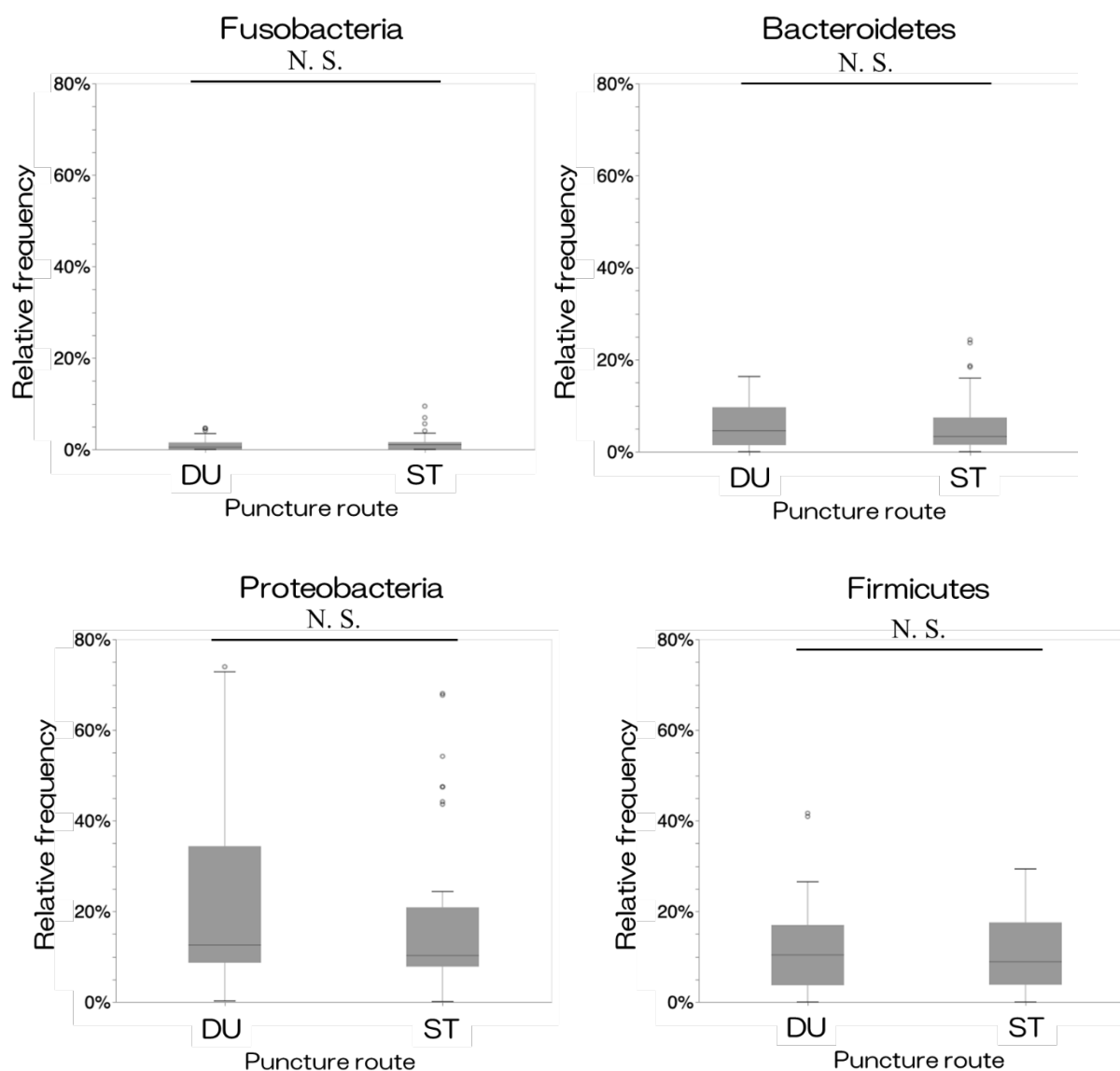


図 13 : *Delftia* 属の Resectable 膵癌、Unresectable 膵癌

Delftia 属は Resectable 膵癌で特徴的に認めた。

RE, resectable; UR, unresectable

また、EUS-FNA の穿刺部位（胃、十二指腸）による膵癌フローラの相違の有無について検討した。穿刺部位によって、門レベルの組成において主要な門（*Proteobacteria*、*Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Actinobacteria*、*Fusobacteria*）に有意差を認めなかった（図 14）。



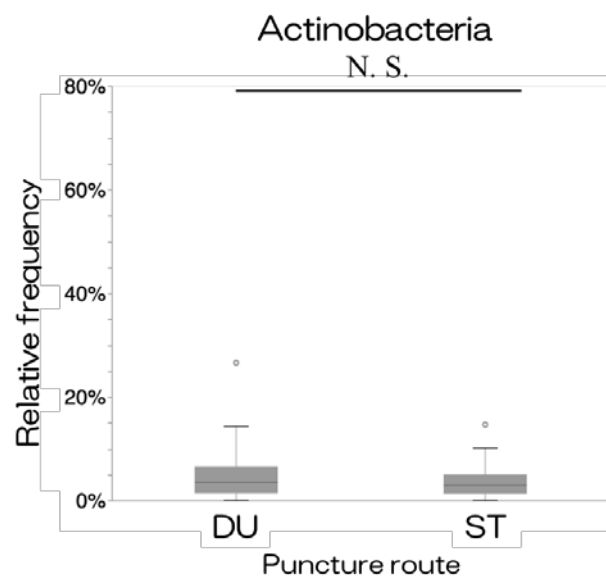


図 14：穿刺部位ごとの膵癌フローラの主要な細菌（門レベル）の比較
膵癌フローラの主要な細菌（門レベル）は穿刺部位ごとで有意差を認めなかった。

DU, duodenum; PC, pancreatic cancer; ST, stomach

また、膵癌検体の中で最優勢菌が *Proteobacteria* 門ではない 4 症例を認め、それぞれの症例の穿刺部位のフローラと膵癌フローラを比較したが、属レベルで 1 位から 5 位まで重なった症例は認めなかった（表 3）。

表 3：膵癌フローラ的最優勢菌が *Proteobacteria* 門以外の症例の膵癌フローラと穿刺部位のフローラの比較

Pt	Location	Biopsy	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th
1	Head	DU	<i>Prevotella</i>	<i>Rothia</i>	<i>Veillonella</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Atopobium</i>
		PC	<i>Prevotella</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Veillonella</i>	<i>Rothia</i>	<i>Actinomyces</i>
4	Body	ST	<i>Prevotella</i>	<i>Veillonella</i>	<i>Rothia</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Actinomyces</i>
		PC	<i>Prevotella</i>	<i>Veillonella</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Rothia</i>	<i>Neisseria</i>
12	Head	DU	<i>Neisseria</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Porphyromonas</i>
		PC	<i>Chloroplast</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Bacillus</i>
24	Head	DU	<i>Acinetobacter</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Rothia</i>	<i>Mitochondria</i>	<i>Prevotella</i>
		PC	<i>Rothia</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Veillonella</i>

DU, duodenum; PC, pancreatic cancer; ST, stomach

【考察】

本研究で、EUS-FNA で採取した検体を用いた膵癌フローラの 16S rRNA 解析が多くの症例で可能であることが明らかになった。膵癌フローラ研究に関する既報のほとんどは外科切除検体を用いており (Geller et al., 2017; Nejman et al., 2020; Noticewala et al., 2020; Pushalkar et al., 2018; Riquelme et al., 2019)、外科治療が適応にならない進行膵癌症例に関して膵癌フローラの解析が困難なことが問題点であった。本研究の結果から、EUS-FNA 検体を用いることで進行膵癌のフローラについても解析が可能となった。

本研究では膵癌フローラ検出率の低下に有意に関連する因子を認めなかったが、膵体尾部癌、胃からの穿刺、制酸薬の使用がない症例で検出率が低い傾向であった。膵癌フローラは十二指腸乳頭から侵入すると言われており (Geller et al., 2017)、体尾部癌には細菌が少ない可能性がある。また、制酸薬の使用は腸内フローラにも影響することが報告されており (Imhann et al., 2016; Jackson et al., 2016)、膵癌フローラの形成にも関連する可能性がある。

膵癌フローラの組成については、門レベルでは *Proteobacteria* 門 (Geller et al., 2017; Nejman et al., 2020; Pushalkar et al., 2018) を多く認めるという報告が多い。目レベルでは *Enterobacteriales* (Nejman et al., 2020)、*Pseudomonadales* (Nejman et al., 2020) などが、属レベルでは *Pseudomonas* (Pushalkar et al., 2018)、*Elizabethkingia* (Pushalkar et al., 2018) などが優勢な細菌として報告されている。また、優勢菌ではないが、膵癌術後の予後良好群と不良群を比べると、予後良好群では *Pseudoxanthomonas*、*Saccharopolyspora*、*Streptomyces* を多く認めていた (Riquelme et al., 2019)。上述の如く、報告により若干のばらつきはあるものの、膵癌フローラは *Proteobacteria* 門、*Gammaproteobacteria* 網が多いことが複数の研究で示されている。本研究では *Proteobacteria* 門を、下位レベルの分類では *Acinetobacter* 属、*Pseudomonas* 属が特徴的な細菌として認めており、既報に矛盾しない結果であると考ええる。

消化管は部位によってもフローラ組成が異なることが報告されている (Ou et al., 2009)。十二指腸は大腸に比べると *Proteobacteria* 門を多く認めるが (Ou et al., 2009)、全体では *Firmicutes* 門が最優勢菌とされている (Mei et al., 2018; Ou et al., 2009)。また、悪性腫瘍は原発巣によって腫瘍フローラに含まれる細菌の種類が異なることが報告されている (Nejman et al., 2020)。腫瘍フローラは、悪性腫瘍の発生、進展を促進することが報告されている。また、大腸癌では肝転移に関連しており、原発巣のみならず転移巣でも腫瘍内フローラを認めて

いる。以上の事から腫瘍フローラは単純に原発組織および近傍に存在する常在細菌叢が受動的に取り込まれているわけではなく、腫瘍の生存に寄与する細菌が選択されている可能性がある。今回の検討で膵癌フローラの α 多様性が十二指腸に比べて低いこと、異なる組成であることから、膵癌フローラは解剖学的な近さ、および常在細菌叢の豊富さから十二指腸フローラが供給源と思われるが、その一部が膵癌フローラとして定着するような選択圧が存在する可能性がある。

今回の研究ではサブグループ解析として、進行膵癌の膵癌フローラについて多数例による解析を初めて行った。前述の如く、進行膵癌は手術検体を得られないため既報では膵癌フローラ解析の対象から外れていた。本研究は早期膵癌、進行膵癌ともに含んでおり、進行期によるフローラの違いを検討した。膵癌は進行期によって α 多様性、 β 多様性は有意差がなく、門レベルでも主要な門の組成に有意な偏りを認めなかった。よって、早期膵癌と進行膵癌のフローラは大きな違いがないといえる。しかしながら、早期膵癌においては、*Deftia* 属が多い傾向があった。*Deftia* 属が膵癌で多く認める生物学的機序については不明だが、既報では膵癌患者と対照患者の十二指腸フローラを比較したところ、膵癌患者の十二指腸で *Deftia* 属を多く認めたとする報告 (Mei et al., 2018) があり、膵癌の発生初期、進展に関連する可能性がある。また、進行膵癌では背景消化管の多様性が低下していることが示唆された。進行膵癌では経口摂取不良、それによる食習慣の変更などを背景に消化管のフローラが乱れ、dysbiosis が生じている可能性がある。その臨床的な意義は不明だが、前述の如く膵癌フローラは消化管由来と考えられるため、消化管フローラは膵癌フローラの形成に影響したり、膵癌患者の臨床的アウトカムに関連する可能性がある。

将来的に、膵癌フローラは膵癌治療の新たな標的になることが期待される。ヒト膵癌フローラには *Gammaproteobacteria* 網に分類される細菌が多く含まれ、これらの細菌は代謝酵素としてシチジンデアミナーゼの long isoform (CDD_L) を持っており Gemcitabine を不活化することで Gemcitabine の治療耐性に関連している可能性が報告されている (Geller et al., 2017)。Gemcitabine は膵癌のキードラッグであり、併用療法である Gemcitabine + nab-paclitaxel 療法 (Von Hoff et al., 2013) は進行膵癌の標準的治療法として、また Gemcitabine + S-1 療法 (Unno et al., 2019) は切除可能膵癌において提案されるべき治療と位置づけられている。臨床的には、少数例の後方視的研究だが、膵癌における Gemcitabine (併用療法を含む) の有効性が抗生剤使用例 (使用歴および治療中の使用) にて良好だったとの報告がある (Imai et al., 2019; Nakano et al., 2020; Sunakawa et al., 2018)。本研究でも膵癌フローラは *Gammaproteobacteria* 網の細菌を多く含んでおり、膵癌フローラは Gemcitabine に対する耐性に関連するという仮説を支持する結果である。抗生剤やプロバイ

オティクスを用いて膵癌フローラを改変することで Gemcitabine 併用療法の有効性を改善でき、将来的には化学療法とフローラ治療が膵癌に対する新たな治療戦略となる可能性がある。しかしながら、上記コンセプトはエビデンスが不足しており前向き臨床試験にて検証する必要がある。

本研究の Limitation として、EUS-FNA は胃または十二指腸の壁を貫いて深部臓器である膵臓内の腫瘍を生検する手技であり、胃または十二指腸のフローラがコンタミネーションする可能性が挙げられる。我々の結果では、①膵癌フローラは胃、十二指腸フローラと比べて多様性が異なり、フローラの集団として異なること、また、門レベルの組成において膵癌フローラと胃・十二指腸フローラは大きな偏りがあること、②本研究で得られた膵癌フローラは *Proteobacteria* 門が優位であり既報と比べて矛盾がない結果であったこと、③穿刺部位が胃および十二指腸からであっても門レベルでフローラに偏りを認めなかったことから、EUS-FNA 検体で得られた膵癌フローラの結果には大きなコンタミネーションはないと判断するが、微小なコンタミネーションの可能性は否定できないと考える。更に、最近になり、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を用いてフローラ解析を行い、手術検体と比べて多様性、門レベルで有意差を認めなかったとの報告がされ (Masi et al., 2020)、内視鏡的に採取した検体がフローラ解析に有用であることを示唆している。本研究では FFPE 標本との比較検討は行っていないが、将来的には同一症例の EUS-FNA 凍結保存検体 (本研究で解析)、EUS-FNA 検体の FFPE 標本、手術検体の FFPE 標本との比較を行う予定であるが、現在は切除可能膵癌においても術前補助化学療法を行うことが増えており (本研究においても切除可能膵癌例は多数が術前補助療法を施行されている)、手術標本との比較を行う際には化学療法、化学放射線療法などの治療により修飾が起きている可能性があることに留意する必要がある。

今後の展望として、膵癌フローラと臨床アウトカムの関連性の検討を予定している。本研究では化学療法 (術前化学療法を含む) 施行例が多く、また約半数で外科切除も行われているが、学位論文執筆時点で予後などの臨床アウトカムの関連性につき検討ができなかった。大きな理由としてはイベント数が少ないことが挙げられる。将来的には本研究のアップデート解析として、また進行膵癌における化学療法の有効性の効果予測因子としての検討など、新たな観察研究として行う予定である。

また、口腔・腸内フローラと膵癌フローラの関連性の検討が挙げられる。本研究では、唾液、便検体は採取しておらず、膵癌フローラと口腔内・腸内フローラとの比較はできなかった。口腔内フローラは膵癌の発症リスクと関連することが報告されている (Fan et al., 2018)。また、膵癌症例は非膵癌症例と比べて腸内フローラに *Proteobacteria* 門を多く認めていること、腸内フローラは膵癌患

者と非膵癌患者で異なること (Half et al., 2019; Ren et al., 2017)、腸内フローラは膵癌フローラをある程度反映している可能性がある。膵癌フローラと口腔・腸内フローラを比較検討することで、膵癌フローラと消化管フローラの関連性の更なる理解につながることが期待される。また、口腔内フローラ、腸内フローラの採取は膵癌フローラよりも非侵襲的・簡便であり、これらが膵癌フローラのサロゲートマーカーとして有用である可能性がある。

更には、最近、膵癌組織内に真菌が検出され真菌叢 (mycobiome)、膵癌の進行や化学療法への耐性に関連するとの報告がされており (Aykut et al., 2019)、今後検討が進んでいくと思われる。膵癌 EUS-FNA 検体を用いた真菌叢の解析に関する既報はないが、フローラ解析と同様に有用である可能性があり、将来的に検討を行いたい。

【総括及び結論】

①本研究によって以下の新知見が得られた。

- ・EUS-FNA で得られた検体を用いて膵癌フローラの解析が可能であることを明らかにした。

- ・膵癌フローラの構成は胃や十二指腸など背景となる消化管と比べて α 多様性が低く、 β 多様性を比較すると有意に異なっていることが判明した。

- ・膵癌フローラの構成は *Proteobacteria* 門が多く、他の主要な門 (*Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, *Fusomabacteria*) は少なかった。

- ・膵癌フローラの属レベルの解析では、*Acinetobacter* 属、*Pseudomonas* 属が多く認められた。

- ・進行膵癌の膵癌フローラの解析が可能であった。進行膵癌は、早期膵癌と比べて α 多様性、 β 多様性、門レベルのフローラの組成で有意差はなく、大きな違いはなかった。しかし、属レベルで *Delftia* 属を多く認めた。早期膵癌と進行膵癌において、フローラにわずかな偏りが存在する可能性があることが示された。

②新知見の意義

本研究の結果、EUS-FNA 検体を用いることで、従来の切除検体のみの解析では不可能であった、進行膵癌も含めた膵癌フローラの解析が可能となった。また、膵癌に対する治療開始前の膵癌フローラが解析可能であり、膵癌に対する治療の効果予測因子としての検討が可能となった。

③今後の研究展開

膵癌フローラと膵癌に対する化学療法の有効性の関連性など、本研究の手法を用いて膵癌フローラと臨床アウトカムの検討が進むことが期待される。また、口腔フローラや腸内フローラなどほかの部位のフローラと膵癌フローラの関連性や、膵癌真菌叢の解析も進むことが期待される。

④今後の課題

本研究では EUS-FNA 検体を用いた細菌叢解析で大きなコンタミネーションを生じないことが示されたが微小なコンタミネーションが生じる可能性は否定で

きない。将来的に膀胱癌フローラと臨床的アウトカムに関連性を評価する際には、慎重な解釈が必要である。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、有益な御指導・御助言を頂きました、北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室 坂本直哉教授に深く感謝いたします。

同教室：小松嘉人准教授、川本泰之助教には、臨床研究及びトランスレーショナル研究に対して、その心構え、信念、データ解析、論文作成そして学会での発表方法など、あらゆる面において御指導・御支援頂きました、厚く御礼申し上げます。

臨床においては検体の採取、回収、臨床試験参加同意取得などにご尽力頂きました、北海道大学病院消化器内科 化学療法グループ、胆膵グループの諸先生方に深謝いたします。

データ解析においては、御指導頂きました北海道大学大学院先端生命科学研究院数理生物学研究室 中岡慎治准教授、太田圭祐さんに厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究において膵癌、胃、十二指腸検体の提供と同意をして頂いた患者さんに深謝いたします。

【利益相反】

本研究に関して利益相反は存在しない。

【引用文献】

Aykut, B., Pushalkar, S., Chen, R., Li, Q., Abengozar, R., Kim, J.I., Shadaloey, S.A., Wu, D., Preiss, P., Verma, N., *et al.* (2019). The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL. *Nature* *574*, 264-267.

Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., *et al.* (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol.* *37*, 852-857.

Cani, P.D. (2018). Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* *67*, 1716.

Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.-L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardière, C., *et al.* (2011). FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med.* *364*, 1817-1825.

Fan, X., Alekseyenko, A.V., Wu, J., Peters, B.A., Jacobs, E.J., Gapstur, S.M., Purdue, M.P., Abnet, C.C., Stolzenberg-Solomon, R., Miller, G., *et al.* (2018). Human oral microbiome and prospective risk for pancreatic cancer: a population-based nested case-control study. *Gut* *67*, 120.

Geer, R.J., and Brennan, M.F. (1993). Prognostic indicators for survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg.* *165*, 68-72; discussion 72-63.

Geller, L.T., Barzily-Rokni, M., Danino, T., Jonas, O.H., Shental, N., Nejman, D., Gavert, N., Zwang, Y., Cooper, Z.A., Shee, K., *et al.* (2017). Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science* *357*, 1156-1160.

Gopalakrishnan, V., Spencer, C.N., Nezi, L., Reuben, A., Andrews, M.C., Karpinets, T.V., Prieto, P.A., Vicente, D., Hoffman, K., Wei, S.C., *et al.* (2018). Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* *359*, 97-103.

Half, E., Keren, N., Reshef, L., Dorfman, T., Lachter, I., Kluger, Y., Reshef, N., Knobler, H., Maor, Y., Stein, A., *et al.* (2019). Fecal microbiome signatures of pancreatic cancer patients. *Sci Rep.* *9*, 16801.

Hirata, K., Kuwatani, M., Suda, G., Ishikawa, M., Sugiura, R., Kato, S., Kawakubo, K., and Sakamoto, N. (2019). A Novel Approach for the Genetic Analysis of Biliary Tract Cancer Specimens Obtained Through Endoscopic Ultrasound-Guided Fine Needle Aspiration Using Targeted Amplicon Sequencing. *Clin Transl Gastroenterol.* *10*, e00022.

Hucl, T., Wee, E., Anuradha, S., Gupta, R., Ramchandani, M., Rakesh, K., Shrestha, R., Reddy, D.N., and Lakhtakia, S. (2013). Feasibility and efficiency of a new 22G core needle: a prospective comparison study. *Endoscopy* *45*, 792-798.

Iida, N., Dzutsev, A., Stewart, C.A., Smith, L., Bouladoux, N., Weingarten, R.A., Molina, D.A., Salcedo, R., Back, T., Cramer, S., *et al.* (2013). Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science* *342*, 967-970.

Imai, H., Saijo, K., Komine, K., Otsuki, Y., Ohuchi, K., Sato, Y., Okita, A., Takahashi, M., Takahashi, S., Shiota, H., *et al.* (2019). Antibiotic therapy augments the efficacy of gemcitabine-containing regimens for advanced cancer: a retrospective study. *Cancer Manag Res* *11*, 7953-7965.

Imai, H., Saijo, K., Komine, K., Yoshida, Y., Sasaki, K., Suzuki, A., Ouchi, K., Takahashi, M., Takahashi, S., Shiota, H., *et al.* (2020). Antibiotics Improve the Treatment Efficacy of Oxaliplatin-Based but Not Irinotecan-Based Therapy in Advanced Colorectal Cancer Patients. *J Oncol* *2020*, 1701326-1701326.

Imhann, F., Bonder, M.J., Vich Vila, A., Fu, J., Mujagic, Z., Vork, L., Tigchelaar, E.F., Jankipersadsing, S.A., Cenit, M.C., Harmsen, H.J.M., *et al.* (2016). Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut* *65*, 740-748.

International Agency for Research on Cancer, W.H.O. Global Cancer Observatory 2018.

Jackson, M.A., Goodrich, J.K., Maxan, M.-E., Freedberg, D.E., Abrams, J.A., Poole, A.C., Sutter, J.L., Welter, D., Ley, R.E., Bell, J.T., *et al.* (2016). Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota. *Gut* *65*, 749-756.

Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., and Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* *21*, 8787-8803.

Kameta, E., Sugimori, K., Kaneko, T., Ishii, T., Miwa, H., Sato, T., Ishii, Y., Sue, S., Sasaki, T.,

Yamashita, Y., *et al.* (2016). Diagnosis of pancreatic lesions collected by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration using next-generation sequencing. *Oncol Lett* 12, 3875-3881.

Kostic, A.D., Gevers, D., Pedamallu, C.S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A.M., Ojesina, A.I., Jung, J., Bass, A.J., Tabernero, J., *et al.* (2012). Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* 22, 292-298.

Masi, A.C., Oppong, Y.E.A., Haugk, B., Lamb, C.A., Sharp, L., Shaw, J.M., Stewart, C.J., and Oppong, K.W. (2020). Endoscopic ultrasound (EUS)-guided fine needle biopsy (FNB) formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) pancreatic tissue samples are a potential resource for microbiota analysis. *Gut*, gutjnl-2020-322457.

Matson, V., Fessler, J., Bao, R., Chongsuwat, T., Zha, Y., Alegre, M.L., Luke, J.J., and Gajewski, T.F. (2018). The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* 359, 104-108.

Mei, Q.X., Huang, C.L., Luo, S.Z., Zhang, X.M., Zeng, Y., and Lu, Y.Y. (2018). Characterization of the duodenal bacterial microbiota in patients with pancreatic head cancer vs. healthy controls. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP)* [et al] 18, 438-445.

Nakano, S., Komatsu, Y., Kawamoto, Y., Saito, R., Ito, K., Nakatsumi, H., Yuki, S., and Sakamoto, N. (2020). Association between the use of antibiotics and efficacy of gemcitabine plus nab-paclitaxel in advanced pancreatic cancer. *Medicine* 99, e22250.

Nejman, D., Livyatan, I., Fuks, G., Gavert, N., Zwang, Y., Geller, L.T., Rotter-Maskowitz, A., Weiser, R., Mallel, G., Gigi, E., *et al.* (2020). The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science* 368, 973-980.

Noticewala, S.S., Lin, D., Kouzy, R., Maitra, A., Colbert, L.E., and Taniguchi, C.M. (2020). Pancreatic cancer intratumoral microbiome and characteristics within paired patient samples. *J Clin Oncol.* 38, 744-744.

O'Hara, A.M., and Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 7, 688-693.

- Ou, G., Hedberg, M., Hörstedt, P., Baranov, V., Forsberg, G., Drobni, M., Sandström, O., Wai, S.N., Johansson, I., Hammarström, M.L., *et al.* (2009). Proximal small intestinal microbiota and identification of rod-shaped bacteria associated with childhood celiac disease. *Am J Gastroenterol.* *104*, 3058-3067.
- Pushalkar, S., Hundeyin, M., Daley, D., Zambirinis, C.P., Kurz, E., Mishra, A., Mohan, N., Aykut, B., Usyk, M., Torres, L.E., *et al.* (2018). The Pancreatic Cancer Microbiome Promotes Oncogenesis by Induction of Innate and Adaptive Immune Suppression. *Cancer Discov.* *8*, 403-416.
- Ren, Z., Jiang, J., Xie, H., Li, A., Lu, H., Xu, S., Zhou, L., Zhang, H., Cui, G., Chen, X., *et al.* (2017). Gut microbial profile analysis by MiSeq sequencing of pancreatic carcinoma patients in China. *Oncotarget* *8*, 95176-95191.
- Reynolds, J.P., Zhou, Y., Jakubowski, M.A., Wang, Z., Brainard, J.A., Klein, R.D., Farver, C.F., Almeida, F.A., and Cheng, Y.W. (2017). Next-generation sequencing of liquid-based cytology non-small cell lung cancer samples. *Cancer Cytopathol.* *125*, 178-187.
- Riquelme, E., Zhang, Y., Zhang, L., Montiel, M., Zoltan, M., Dong, W., Quesada, P., Sahin, I., Chandra, V., San Lucas, A., *et al.* (2019). Tumor Microbiome Diversity and Composition Influence Pancreatic Cancer Outcomes. *Cell* *178*, 795-806.e712.
- Routy, B., Le Chatelier, E., Derosa, L., Duong, C.P.M., Alou, M.T., Daillere, R., Fluckiger, A., Messaoudene, M., Rauber, C., Roberti, M.P., *et al.* (2018). Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* *359*, 91-97.
- Roy, S., and Trinchieri, G. (2017). Microbiota: a key orchestrator of cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* *17*, 271-285.
- Schroeder, B.O., and Backhed, F. (2016). Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med.* *22*, 1079-1089.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., and Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* *12*, R60.
- Serna, G., Ruiz-Pace, F., Hernando, J., Alonso, L., Fasani, R., Landolfi, S., Comas, R., Jimenez, J.,

Elez, E., Bullman, S., *et al.* (2020). *Fusobacterium nucleatum* persistence and risk of recurrence after preoperative treatment in locally advanced rectal cancer. *Ann Oncol.* *31*, 1366-1375.

Society., A.C. (2020). Cancer Facts & Figures 2020. American Cancer Society.

Sunakawa, Y., Arai, H., Izawa, N., Mizukami, T., Horie, Y., Doi, A., Hirakawa, M., Ogura, T., Tsuda, T., and Nakajima, T.E. (2018). Antibiotics may enhance the efficacy of gemcitabine treatment for advanced pancreatic cancer. *Ann Oncol.* *29*, viii251-viii252.

Tripathi, A., Debelius, J., Brenner, D.A., Karin, M., Loomba, R., Schnabl, B., and Knight, R. (2018). The gut–liver axis and the intersection with the microbiome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* *15*, 397-411.

Unno, M., Motoi, F., Matsuyama, Y., Satoi, S., Matsumoto, I., Aosasa, S., Shirakawa, H., Wada, K., Fujii, T., Yoshitomi, H., *et al.* (2019). Randomized phase II/III trial of neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine and S-1 versus upfront surgery for resectable pancreatic cancer (Prep-02/JSAP-05). *J Clin Oncol.* *37*, 189-189.

Von Hoff, D.D., Ervin, T., Arena, F.P., Chiorean, E.G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S.A., Ma, W.W., Saleh, M.N., *et al.* (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med.* *369*, 1691-1703.

Wang, Y., Yang, G., You, L., Yang, J., Feng, M., Qiu, J., Zhao, F., Liu, Y., Cao, Z., Zheng, L., *et al.* (2019). Role of the microbiome in occurrence, development and treatment of pancreatic cancer. *Mol Cancer.* *18*, 173.

Yamamura, K., Baba, Y., Nakagawa, S., Mima, K., Miyake, K., Nakamura, K., Sawayama, H., Kinoshita, K., Ishimoto, T., Iwatsuki, M., *et al.* (2016). Human Microbiome *Fusobacterium Nucleatum* in Esophageal Cancer Tissue Is Associated with Prognosis. *Clin Cancer Res.* *22*, 5574-5581.

Yamaoka, Y., Suehiro, Y., Hashimoto, S., Hoshida, T., Fujimoto, M., Watanabe, M., Imanaga, D., Sakai, K., Matsumoto, T., Nishioka, M., *et al.* (2018). *Fusobacterium nucleatum* as a prognostic marker of colorectal cancer in a Japanese population. *J Gastroenterol.* *53*, 517-524.

Yeo, C.J., Cameron, J.L., Lillemoe, K.D., Sitzmann, J.V., Hruban, R.H., Goodman, S.N., Dooley, W.C., Coleman, J., and Pitt, H.A. (1995). Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas. 201 patients. *Ann Surg.* 221, 721-731; discussion 731-723.

国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」.人口動態統計.
(https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/dl/index.html) 2020 年 8 月 29 日アクセス.

日本内視鏡学会. (2012). 抗血栓薬服用者に対する消化器内視鏡診療ガイドライン. 日本消化器内視鏡学会雑誌 54, 2075-2102

日本膵臓癌学会. (2016). 膵癌取り扱い規約第 7 版. (東京：金原出版).

服部 正平. (2014). ヒト腸内マイクロバイオーーム解析のための最新技術. 日本臨床免疫学会会誌 37, 412-422.