

論文の内容の要旨

論文題目 The impact of human gut microbiota on the response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced esophageal squamous cell carcinoma: A single center prospective study

(cStage II/III食道癌に対する術前ドセタキセル+シスプラチン+5-FU (DCF) 療法の効果に対し、腸内細菌叢が与える影響を検討する観察研究)

氏名 浅岡 礼人

【背景】

本邦において、切除可能な局所進行癌に対する術前補助化学療法は、過去の臨床試験の結果に基づき、標準治療の一つとして位置づけられている。現在の標準的な術前補助化学療法のレジメンは、シスプラチンと5-FUを併用したCF療法である。近年報告された臨床試験の結果から、CF療法にドセタキセルを加えた3剤療法（DCF療法）が有効である可能性が示唆されており、当院においても術前化学療法レジメンとして選択されている。また、海外で行われたRTOG 8911 trialにおいて、術前補助療法が奏効した患者群の良好な生命予後が示されている一方で、非奏効であった患者群では化学療法による恩恵を受けられない上に、病勢の進行、有害事象や手術リスクのみを負うことになる。故に、化学療法が奏効するか否かを治療開始前に予測できるバイオマーカーの開発が望まれている。これまでに分子生物学の分野において数多くの研究がなされ、マイクロRNAの発現量、DNAのメチル化、特定の遺伝子の発現といったバイオマーカーによる治療奏効群の予測が有用である可能性が示されている。しかし、これら生検組織を用いた分子生物学的解析では生検組織局所の生物学的特徴と腫瘍全体の分子病態との乖離、あるいは再発・多発病変での総合的な分子病態との乖離などの課題があり、全身の病態を反映していない可能性も指摘されている。このように種々のバイオマーカーによる治療奏効群の予測可能性が模索されてきたが、日常臨床への適用は実現していない。

近年、培養非依存的な分子生物学的手法に加え、次世代高速シーケンサーの登場により、腸内細菌の研究が大いに発展した。ヒトの腸管内には100兆個以上の細菌が共生して腸内細菌叢を形成しており、腸内環境が様々な疾患の発症に関与している他、薬剤の代謝などにも関与していることが解明されてきた。癌治療に関しては、他癌腫において特定の細菌の存在が抗がん剤の治療効果に影響を与える可能性が報告されており、中でもメラ

ノーマに対する抗ヒトPD-1モノクローナル抗体の効果が、特定の腸内細菌の存在や、腸内細菌の多様性と関連していると報告されて以降、世界的に大きな注目を集めている。

一方、食道癌においては発癌と腸内細菌の関連に関する研究が報告されているものの、抗がん剤の効果と腸内細菌の関連を探索した研究は報告されていない。そこで、本臨床研究では化学療法の効果予測のバイオマーカーとして、腸内細菌叢に着目した。

【方法】

本研究のデザインは前向き観察研究で、東京大学倫理委員会での承認を受けた後に開始した(No. 2018066NI)。研究対象は、TNM分類でT4を除くStage II、IIIの進行扁平上皮癌食道癌で、プロトコルの適格基準を満たし、術前化学療法を受ける患者とした。対象患者は以下の治療を受けた。術前化学療法は、DCF療法を3週1コースとして3コース施行した。また、好中球減少に伴う発熱性好中球減少を予防するために、レボフロキサシン 500mg 分11（またはシプロフロキサシン 600mg 分3）を各コース day5-15に内服した。化学療法施行後にCT検査、内視鏡検査を施行し、RECIST version 1.1に基づいた効果判定を行った。切除可能と判断された場合にはD2リンパ節郭清以上の郭清を伴う根治的食道切除術をうけた。切除された食道検体の病理所見のうち組織学的奏効度によって、化学療法の奏効、非奏効を判定し、グレード2、3を奏効、グレード0、1を非奏効とした。さらに化学療法後の画像評価で病勢進行(Progressive Disease、PD)と判定されて非切除となった場合も、病理効果判定の結果は得られないが、非奏効と判定して非奏効群に含めた。

研究参加に同意した患者の糞便を、化学療法1コース目、2コース目、3コース目、術前と合計4回、各入院後から化学療法投与開始前（もしくは手術前）までの期間に採取し、対象患者の糞便からDNAを抽出した。アダプター配列、インデックス配列、シーケンスプライマー配列及び16S rRNA遺伝子を標的としたユニバーサルプライマー配列を組み合わせたプライマーを用い、糞便からのDNA抽出物を鋳型としたPCR法にて16S rRNA遺伝子のV3-V4領域を増幅した。PCR産物の精製の後、次世代シーケンサー Miseq (Illumina)を用いた16S rRNAメタゲノム解析を行った。得られたシーケンスデータを97%以上の相同性を示す配列を同一のoperational taxonomic units (OTU)としてクラスタリングし、さらに各OTUの代表配列の菌種の推定にはGreengenes (ver. 13_8)を用い、糞便検体ごとのOTU構成比を算出した。化学療法奏効群、非奏効群における腸内細菌の相違と、化学療法期間中の腸内細菌の経時的変化を比較検討するために以下の解析手法

を用いた。 α 多様性にはレアファクション解析、 β 多様性にはUnifrac距離を用いた主座標分析、2群間の細菌叢比較にはlinear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe)解析を用いた。

【結果】

2019年3月から2020年4月までの間に34名の患者が研究に同意、参加した。うち2名が同意撤回、3名が途中で化学放射線療法へと方針転換し、29名がDCF療法を完遂した。29名のうち2名が手術以外の治療法を希望し、1名が画像による効果判定でPDと判定され非奏効群へと分類された。最終的に26名が食道切除術を受け、病理診断の結果、グレード0が0名、グレード1が15名、グレード2が6名、グレード3が5名であり奏効群11名、非奏効群16名となった。合計27名の患者から採取した糞便105検体の解析を行った。奏効群と非奏効群の二群間において、治療開始前臨床病期、年齢、性別、化学療法期間中の有害事象出現割合に有意差を認めなかった。

各検体に含まれる腸内細菌の種数を意味する α 多様性においては、2群間に統計学的有意差は認められなかった($p = 0.799$)。また検体間の腸内細菌構成の類似度を示す β 多様性においても統計学的有意差は認められなかった(Weighted UniFrac distance; $p = 0.265$)。またLEfSe解析を行い、奏効群と非奏効群のそれぞれにおいて有意に豊富な細菌を同定したところ、奏効群ではParaprevotellaceae科、Paraprevotella属、Phascolarctobacterium属が有意に豊富であり、非奏効群ではTuricibacter属とOscillospira属が有意に豊富であることがわかった。

また化学療法開始前から手術前までの経時的な腸内細菌叢の変化を解析した。 α 多様性の変化に有意差はないものの(Kruskal-Wallis test、 $p = 0.270$)、 β 多様性に有意な経時的变化を認めた(Kruskal-Wallis test、 $p < 0.001$)。検体採取をした各時点において、奏効群と非奏効群で有意に豊富な菌種に一貫性は認められなかった。

【考察】

化学療法開始前の腸内細菌叢解析の結果、奏効群で2種類、非奏効群で2種類の特長的な細菌が属レベルで同定された。いずれの細菌も過去の報告で何らかの疾患との関連や薬物動態への影響が示唆されている。機序として腸内細菌による抗腫瘍活性をもつ物質の産生、薬物代謝の変化、あるいは免疫修飾による抗腫瘍効果などが考えられるが、今回の研究で同定された菌群と癌の関連性についてはほとんど解明されておらず今後の研究が待た

れる。

また化学療法期間中に β 多様性の有意な経時的変化が観察された。シスプラチンは腸内細菌叢の乱れを引き起こすが、ドセタキセルと5-FUに関してはin vitroではあるが腸内細菌への影響がないとされている。しかし、予防的抗菌薬の内服をはじめ、その他の内服薬、食事など様々な要因が複雑に関連しあっている可能性がある。

腸内細菌叢と関連した癌治療に関してマウスモデルの実験では糞便移植により抗腫瘍効果の増強が認められたとの報告があるが、実臨床においては限られた疾患に対して有効性を示すのみで悪性腫瘍に対する治療選択肢としては用いられていない。食道癌において腸内細菌が化学療法の効果に寄与しているとすれば、奏効に関与する細菌叢が含まれた糞便を移植する、もしくは特定の腸内細菌を投与することにより腸内細菌叢を変化させ、化学療法への感受性を変化させるといった新たな治療戦略が開けるかもしれない。

【結論】

本臨床研究では局所進行食道癌患者における腸内細菌叢を解析した。化学療法奏効群、非奏効群の2群間で α 多様性と β 多様性には有意差を認めなかったものの、統計学有意差をもって各群を特徴づける複数の腸内細菌が認められ、化学療法効果を予測するバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。