

特集 がん薬物療法の最前線

## がん免疫療法の最新情報と腸内細菌

昭和大学臨床薬理研究所臨床免疫腫瘍学部門

昭和大学医学部内科学講座（腫瘍内科学部門）

吉村 清

### 緒言

次世代シーケンサーの画期的な発展の恩恵を受け、腸内細菌の研究は爆発的に進んできている。腸内細菌は個人を同定できるほど特異的であり、簡単には変化しないことも分かってきた。さらに、種々の疾患との関連についても精力的に解析が進んでいる。免疫チェックポイント阻害剤の使用は抗PD-1/PD-L1抗体単独療法療法に加え化学/分子標的療法との併用や抗PD-1/CTLA-4抗体の併用療法も多用される。つまり化学/分子標的療法との併用や抗CTLA-4抗体との併用は抗PD-1/PD-L1抗体単独療法よりも頻度や多様性の面で副作用のマネジメントに注意を要する。そこで抗腫瘍の観点と有害事象の観点からがんと腸内細菌あるいは免疫機構について論文的に考察した。われわれは「昭和大学Uバンク」を立ち上げ、さらに多くの臨床検体を用いた免疫学的解析を含め、精力的に研究を進めている。

### 腸内細菌叢の解析

ヒトの腸内には、およそ1,000種類、100兆個の細菌が共生し、重さとして1.5から2kgの腸内細菌叢（腸内フローラとも呼ばれている）を形成していると言われている。この腸内細菌は、いかにしてヒトと共生するようになったのかは実はわかっていない。しかしきわめて重要なパートナーであり、このパートナーとの関係が破綻した状態が、炎症性腸疾患（inflammatory bowel disease：IBD）、リウマチ疾患、肥満症、糖尿病、アトピー、アレルギーなどをひきおこすことが近年知られるようになった。そこでこの状態を、腸内細菌の構成の破綻と言う意味であるディスバイオーシス（dysbiosis）と呼ぶ<sup>1)</sup>。

この腸内細菌叢の解析の近年の目まぐるしい進歩

は、次世代シーケンサーの登場により、遺伝子解析に大きな進歩を生み出した結果から解明されてきたためである。次世代シーケンサーが本格的に登場する以前より、数百万塩基対で構成される細菌のゲノムには、「16SリボゾームRNA領域」という約1,600塩基対の多型性のある領域が存在していることが知られていた。16SリボゾームRNA領域には、数十から百塩基対程度で構成される9か所の超可変領域が存在し、細菌の種類により特徴的な配列を有していることが分かっていた。また、この超可変領域は、同一の細菌種では、配列が保存されていることが知られており、細菌ゲノムの全長をシーケンスするまでもなく16S領域の全長、もしくは一部を読み取り、解析することで、細菌種の同定が可能であると考えられている。次世代シーケンサーによる技術革新は、腸内に生息する細菌の分類や解析の研究を飛躍的に発展させた。現在では、約10年以上をかけて解読してきたおよそ30億塩基対のヒトゲノムも、たった1台の機械を用いて1週間以内に解読することが可能となっている。

次世代シーケンサーでは、使用する機器と検出する方法により違いはあるものの、基本的には数百塩基対程度の遺伝子断片の遺伝子配列情報を大量に読み取る。ゲノム情報など、長い領域の解析では、読み取った断片の重なり部分を認識してつなげて、ゲノムの全長として再構成する。16S領域に存在する超可変領域は、この読取の単位である数百塩基対であれば、1から2か所同一の読み取り範囲でカバーすることが可能である。従って、読み取った一つ一つの断片の情報が細菌の種類として同定されることで、糞便から抽出した細菌のゲノムを同時に解析する16Sメタゲノム解析法が実施可能となる。原理的には、1回の検査で最大1億種類以上の腸

内細菌叢を明らかにすることが可能となった。

糞便のおよそ半分から3分の1は細菌由来とされており、1g当たり100億個程度、ヒトの場合では1日あたり2から3兆個もの細菌が排出される。それらの細菌は、生きて出てくるものもあれば、死んで排出されるもの、更に排出され、すぐに酸素などにより死んでしまう細菌もあると考えられる。16Sメタゲノム解析法による腸内細菌叢の解析では、糞便に含まれる腸内細菌の遺伝子の本体であるDNAを抽出、精製したものを鋳型として、16S領域の一部を増幅するように設定した遺伝子増幅用プライマーを用いて遺伝子増幅する。ここでの遺伝子増幅は通常のPCR法による遺伝子増幅のように何千万倍以上も行う必要はなく、その後の解析に必要な配列などを付けることが一つの目的である。糞便から抽出、精製されるDNAは細菌由来のものだけでなく、宿主であるヒトのDNAや食べ物の残渣などのDNAが含まれるが、それらは基本的には細菌由来の16S領域を持たないため、増幅には関与しない。その後、数百塩基対程度の遺伝子増幅産物を精製、定量し、ライブラリーを作成する。このライブラリーに含まれる遺伝子配列を、次世代シーケンサーを用いて読み取り、データベースと照合することで細菌の種類を同定する。遺伝子検査法を用いることで、培養法では検出できなかった死んだ細菌（死菌）のDNAはもちろん、糞便中に存在する、生きた細菌由来のDNA断片も検出することが可能であり、より腸内細菌叢に近い情報を供すると考えられている。糞便からの遺伝子抽出・精製、遺伝子増幅、増幅産物の精製・定量、ライブラリー作成、シーケンシング、そして解析ソフトを使用しての細菌の同定と割合の算出まで、およそ3日間で終了する。今後、得られた情報が次々とデータベース化されていくと考えられる。このように近年の技術革新で腸内細菌に関する情報が集積しており、腸内細菌と疾患、とりわけがんに関する情報が集積しつつある。

### 腸内細菌叢の形成

腸内細菌は医療分野で大きな話題となっている。ヒト腸内細菌叢の形成は誕生直後に形成され始める。新生児期に形成された腸内フローラは、生涯を通じて不変的なものではなく、構成する細菌の組成は加齢とともに変化する<sup>2)</sup>。腸内フローラの形成過程は不

変的なものではなく、在胎期間や分娩形態、授乳形態などのさまざまな環境因子による影響を受けることが報告されている<sup>3)</sup>。上記で述べたディスバイオーシスの研究により、腸内細菌におけるいわゆる善玉菌と悪玉菌がバランス良く存在することが大事で、主に偏性嫌気性細菌（obligate anaerobic bacteria；発酵菌）を善玉菌と呼び、通性嫌気性細菌が悪玉菌と呼ばれることが多かったが近年のディスバイオーシスの研究の進歩により、必ずしもこの法則が当てはまらないか、善玉菌と悪玉菌と呼ぶ呼称そのものが使われにくくなってきている<sup>4-10)</sup>（図1）。

### 抗生物質と腸内細菌

がんの分野では、がん免疫療法の治療効果と高い相関があるのではないかと考えられるデータが出つつある<sup>11-13)</sup>。また、食道がんや胃がんをはじめ多くの臓器のがんに腸内細菌が関与しているのではないかと考えられている<sup>14)</sup>。悪性黒色腫は米国で特に免疫チェックポイント阻害剤（ICI）が頻用されたことより腸内細菌とICIの関係に関する研究が上記のように進んだ。

興味深いデータとして抗生物質の投与が腸内細菌にICIの治療効果に対して負の影響を強く与えるという論文が有り注目されている（図2）<sup>15)</sup>。

ここでは、腎細胞がん、非小細胞肺がんの免疫チェックポイント阻害剤による治療患者の全生存率、無増悪生存率、全奏効率において検討され、図2に示すようにいずれにおいても、有意差を持って抗生

<p><b>良い細菌</b>  <i>Bacteroides</i>属（短鎖脂肪酸産生）、  <i>Bifidobacterium</i>属（短鎖脂肪酸産生）、  <i>Ruminococcaceae family</i>（短鎖脂肪酸産生：繊細）、  <i>Faecalibacterium</i>（短鎖脂肪酸産生：繊細）、  <i>Bifidobacterium longum</i>（短鎖脂肪酸産生：いわゆるビフィズス菌）、  <i>Enterococcus faecalis</i>                      （Firmicutes 門 Bacilli 綱 Lactobacillales 目 日和見感染や腎盂炎の起因菌）、  <i>Bacteroidetes phylum</i>（大腸炎抑制：日和見感染の起因菌）  <i>Akkermansia muciniphila</i>（ムチン分解、抗炎症）  <i>Enterococcus hirae</i>（<i>Enterococcus faecium</i>と共生心内膜炎、尿路感染症の原因菌種）</p>
<p><b>悪い細菌</b>  <i>Prevotella</i>属、  <i>Bacteroides fragilis</i>（Th17上昇）、  <i>Fusobacterium nucleatum</i></p>

図1 ディスバイオーシスを引き起こすとされる代表的な良い菌、悪い菌の一覧

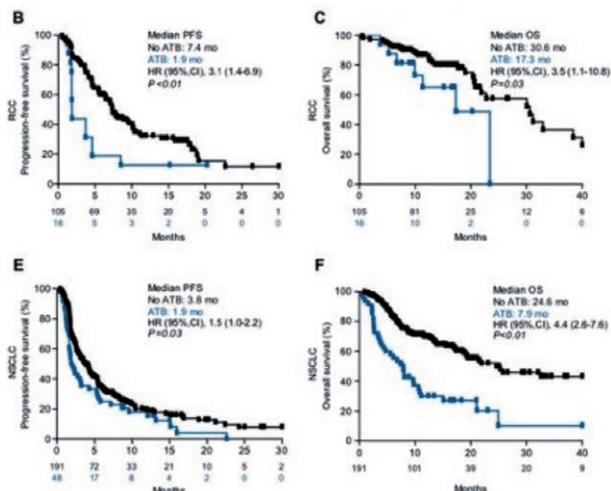


図 2 上段 B, C は腎細胞癌, 下段は非小細胞肺癌に対するそれぞれ左が無増悪生存率, 右が全生存率で抗生剤投与が細い線, 非投与群が太い線である。

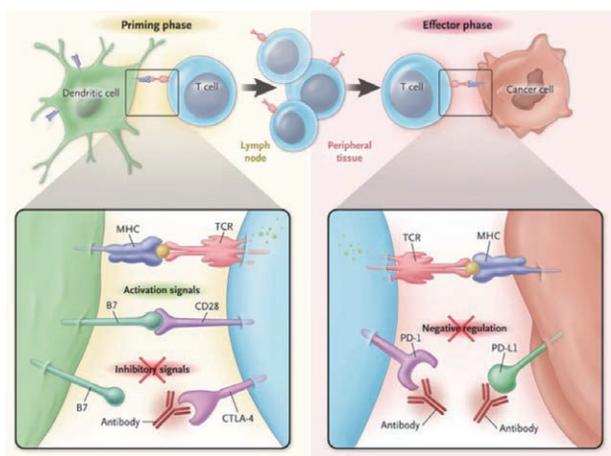


図 3 抗 CTLA-4 抗体はプライミング相, 抗 PD-1 抗体はエフェクター相で主に働く<sup>16)</sup>。

剤非投与群が上回る結果となった。実際には尿路上皮癌でも同様の結果が示されたため、がん種を越えて、抗生剤が免疫チェックポイント阻害剤の有効性を阻害する衝撃の事実が明らかになりつつある。

### 抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体の作用メカニズムと腸内細菌

抗 PD-1 抗体は主に腫瘍と T 細胞間での負の制御機構を抑制する。これはエフェクター相と呼ばれる。これに対して抗 CTLA-4 抗体はリンパ節内で樹状細胞からの抑制系のシグナルブロックすることで T 細

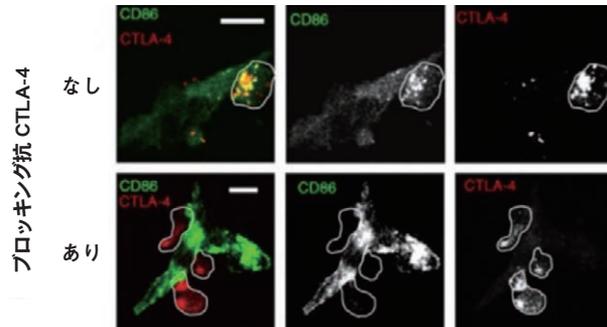


図 4 上段は抗 CTLA4 抗体が無い状態で, 下段は添加した状態. 抗 CTLA4 抗体緑色の CD86 の発現を維持させる<sup>17)</sup>。

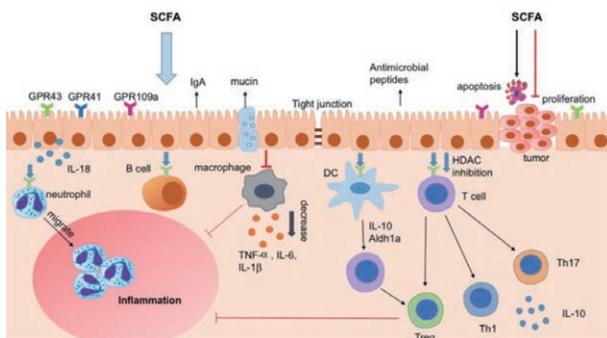


図 5 単鎖脂肪酸は GPR43, GPR41, GPR109a 等の受容体を介して免疫細胞の活性化やサイトカイン産生を誘導する。

胞の活性化を維持する (図 3)<sup>16)</sup>。この時相をプライミング相と呼ぶ。この CTLA-4 による主たる T 細胞活性化の抑制メカニズムは PP2A を介する。しかしながらその後 CTLA-4 は、トランスエンドサイトーシスによって、T 細胞からリガンドである CD86 を捕捉するためである。この現象は抗 CTLA-4 抗体により回避可能でありリガンドの発現を維持させることがわかった (図 4)<sup>17)</sup>。さらに抗腫瘍効果を微小環境で減弱させることや自己免疫疾患を制御することで知られる制御性 T 細胞 (Treg) 上の CTLA-4 のトランスエンドサイトーシスによりは抗原提示細胞 (APC) からリガンドを除去する機構が働き、通常の T 細胞の活性化が起こらないため抗腫瘍効果を発揮できないことが示唆された<sup>18)</sup>。

免疫療法における大きな課題は、有効性のさらなる向上と共に免疫学的有害事象の予測と制御である。

ICI への影響は、Routy<sup>5)</sup>, Matson<sup>9)</sup>, Gopalakrishnan<sup>4)</sup>らが、特定の腸内細菌が抗 PD-1 抗体の臨床効果を

修飾する可能性を報告している。しかし、各グループの報告した腸内細菌叢はそれぞれ異なっており、特定されていない。また国や食生活で腸内細菌叢のパターンは異なっている。そこで昭和大学では、国内施設と連携し日本での腸内細菌叢でのICIへの影響を検索している。

### がんと腸内細菌叢

また、これらの腸内細菌はどのようにして免疫に作用するか現在さまざまな研究がされている。この中でも主な作用機序として単鎖脂肪酸の関与が知られている。単鎖脂肪酸はその受容体の違いなどから作用が変わると考えられるがその詳細は今後の研究によって明らかになっていくものとみられる(図5)<sup>19)</sup>。

ここで重要なこととして、現在われわれを含めて多くの研究者が行っていることは、irAEが起きやすい免疫状態と有効性を発揮しやすい免疫状態を腸内細菌を解析することで推測し、今後の腸内細菌叢の修飾を含めたさまざまな治療によりirAEが起きにくく有効性を発揮しやすい状態に誘導することを目的とした研究が進んでいる。少なくともバイオマーカーとしてこれらの状態を推測可能となれば、治療戦略特に副作用マネジメントが容易になると考えられる。

### 短鎖脂肪酸

上述した善玉菌といわれる偏性嫌気性細菌は、主に食物繊維を栄養源として発酵することで、短鎖脂肪酸(short chain fatty acid: SCFA)を産生する。特にプロピオン酸(propionate)、酢酸(acetate)、酪酸(butyrate)などがこの代表である。

SCFAは免疫の活性や制御を行い、この機構は主にその受容体を介して決定されていると考えられているが未だ不明な部分が多い。いずれにしろ、制御性T細胞の誘導、タイプ1型ヘルパーT細胞の誘導、腸管上皮細胞の増殖維持等、ヒトの免疫・生体恒常性維持に重要な役割を担っている(図5)<sup>19)</sup>。

この分野の特に抗腫瘍効果との関係に関する研究は未だ解明されていない研究も多い。しかしながら食物繊維を栄養源として発酵するSCFAがキーの一つであることは確かであり、食生活における線維の重要性や各SCFAの免疫への影響に関する研究の重要性は増している。近年、SCFA以外にも、腸内細菌によって産生される代謝物の研究も盛んに行

われている。一方、通性嫌気性細菌は、食物繊維を消化する消化酵素の種類・発現が少なく、食物繊維ではなく、単糖、二糖類、脂肪、蛋白ならびにアルコール等西洋化した食事に多く含まれる栄養源を利用することが知られている<sup>20)</sup>。

### 腸内細菌叢データベース—昭和大学Uバンク—とわれわれの取り組み

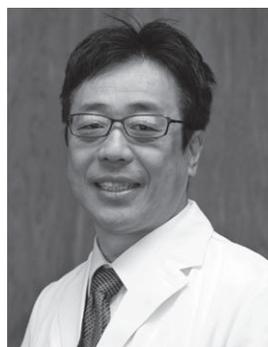
腸内細菌叢は、人種間や国家間に特異的な傾向があることが分かってきている。現在、昭和大学臨床薬理研究所臨床免疫学部門、腫瘍内科や皮膚科などを中心としてUバンク(便バンク)プロジェクトが進行中である。東京、神奈川に8病院、およそ3,200床を有する昭和大学が中心となり、現段階では大阪市立大学、滋賀医科大学、和歌山県立医科大学、神奈川がんセンター、福島県立医科大学などと連携し、100万件のデータを蓄積することを計画している。昭和大学Uバンクでは、患者の便を採取することで腸内細菌叢を検査、データ化すると同時に、舌の上面を綿棒でこすり取った検体を使用しての口腔内細菌叢も検査している。腸内細菌叢は離乳期から小学校低学年性の時期に主たる細菌叢の成分を形成する骨格が形成されると考えられている。また細菌は、飲食したものに付着する形で供給されると同時に、腸内ほどではないが多様性と細菌数を有する口腔内細菌叢からの供給もあると考えられる。口腔内は腸内と違って酸素が存在するため、好気性の細菌が大半を占める細菌叢を形成しており、嫌気性中心の腸内とは全く違ったデータが得られる。しかしながら、口腔内でもプラークを形成して虫歯の原因となるミュータンス菌や、歯周病の原因となるジンジバリス菌などを含むレッドコンプレックスといわれる細菌など、悪さをする嫌気性菌も存在する。昭和Uバンクでは、データベースに患者の背景データとして、年齢、性別、病歴、治療歴に加え、食生活や運動習慣などの生活習慣も蓄積している。合わせて、治療開始前の患者の検査結果とともに、治療継続中、そして治療終了後も継続的に、前向きデータを蓄積している。現在、チェックポイント阻害剤同士の複合療法を始め化学療法との複合療法などの治療効果とirAEにおける腸内細菌叢や口腔内細菌叢との関連性を見いだすことを目的として研究している。

## おわりに

今回、腸内細菌叢とICIの研究を悪性黒色腫の治療における抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体の複合療法を中心にその機構、懸念点、腸内細菌叢の研究の現況などを中心に述べた。今後のICI治療の展開に関して、腸内細菌叢の解析はますます重要となると考えられる。

## 文 献

- 1) Cani PD. Gut microbiota-at the intersection of everything? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14:321-322.
- 2) Arboleya S, Binetti A, Salazar N, *et al*. Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012;79:763-772.
- 3) Backhed F, Roswall J, Peng Y, *et al*. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*. 2015;17:852. (accessed 2021 Mar 4) <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312815002164?via%3Dihub>
- 4) Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, *et al*. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 2018;359:97-103.
- 5) Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, *et al*. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*. 2018;359:91-97.
- 6) Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, *et al*. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe*. 2014;15:382-392.
- 7) Ahn J, Sinha R, Pei Z, *et al*. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105:1907-1911.
- 8) Lepage P, Hasler R, Spehlmann ME, *et al*. Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2011;141:227-236.
- 9) Matson V, Fessler J, Bao R, *et al*. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science*. 2018;359:104-108.
- 10) Dubin K, Callahan MK, Ren B, *et al*. Intestinal microbiome analyses identify melanoma patients at risk for checkpoint-blockade-induced colitis. *Nat Commun*. 2016;7:10391. (accessed 2021 Mar 4) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4740747/pdf/ncomms10391.pdf>
- 11) Vetizou M, Pitt JM, Daillere R, *et al*. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science*. 2015;350:1079-1084.
- 12) Sivan A, Corrales L, Hubert N, *et al*. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*. 2015;350:1084-1089.
- 13) Wang Y, Wiesnoski DH, Helmink BA, *et al*. Fecal microbiota transplantation for refractory immune checkpoint inhibitor-associated colitis. *Nat Med*. 2018;24:1804-1808.
- 14) Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:800-812.
- 15) Derosa L, Hellmann MD, Spaziano M, *et al*. Negative association of antibiotics on clinical activity of immune checkpoint inhibitors in patients with advanced renal cell and non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2018;29:1437-1444.
- 16) Ribas A. Tumor immunotherapy directed at PD-1. *N Engl J Med*. 2012;366:2517-2519.
- 17) Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, *et al*. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*. 2011;332:600-603.
- 18) Soskic B, Qureshi OS, Hou T, *et al*. A trans-endocytosis perspective on the CD28/CTLA-4 pathway. *Adv Immunol*. 2014;124:95-136.
- 19) Sun M, Wu W, Liu Z, *et al*. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol*. 2017;52:1-8.
- 20) Skelly AN, Sato Y, Kearney S, *et al*. Mining the microbiota for microbial and metabolite-based immunotherapies. *Nat Rev Immunol*. 2019;19:305-323.



吉 村 清

昭和大学臨床薬理研究所臨床免疫腫瘍学部門  
昭和大学医学部内科学講座（腫瘍内科学部門）