

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医と食をつなげる新規メカニズムの解明と病態制御法の開発  
(英語) Elucidation of the new mechanism to connect medicine and food

研究開発課題名： (日本語) 腸内細菌由来新規大腸発がんリスク因子を制御する食事要因の解明  
(英語) Elucidation of meal controlling novel risk factor of colorectal cancer produced by microbiome

研究開発担当者 (日本語) 静岡県立大学 薬学部 教授 渡辺賢二  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Professor Kenji Watanabe

実施期間： 平成29年1月4日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 生体試料採取および食事調査  
開発課題名： (英語) Acquisition of biomaterial and meal survey

研究開発分担者 (日本語) 医薬基盤 健康 栄養研究所 健康増進部 部長 宮地元彦  
所属 役職 氏名： (英語) National institution of biomedical innovation, health and nutrition, Department of health promotion and exercise, Chief Motohiko Miyachi

分担研究 (日本語) 生体試料採取および食事調査  
開発課題名： (英語) Acquisition of biomaterial and meal survey

研究開発分担者 (日本語) 京都府立医科大学 分子標的癌予防医学 特任教授 石川秀樹  
所属 役職 氏名： (英語) Department of molecular-targeting cancer prevention, Kyoto Prefectural University of Medicine, Designed Professor Hideki Ishikawa

分担研究 (日本語) コリバクチン大腸発がんモデルの解析  
開発課題名： (英語) Analysis of model mouse by adding colibactin precursors

研究開発分担者 (日本語) 国立がん研究センター 予防研究部 室長 武藤倫弘

所属 役職 氏名: (英語) National cancer center, center for public health sciences, Epidemiology and prevention division, Laboratory Head Michihiro Mutoh

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### 和文

#### 1. 生体試料採取および食事調査 (研究倫理承認)

研究倫理に関して2件の承認申請を行った。1件は、研究課題名「腸内細菌由来新規大腸発がんリスク因子を制御する食事要因の解明」とし、国立医薬基盤・健康・栄養研究所が運営するNEXIS研究の1,085名の登録者のうち、20～80歳までの男女、10歳代毎に最低50名ずつ、少なくとも合計600名を対象とし採取した糞便のうち、300検体を選択し、静岡県立大学で分析するものである。本申請は平成29年2月3日に条件付承認を静岡県立大学学長より得た。もう1件は、研究課題名「遺伝性大腸がん高リスク群患者におけるコリバクチン産生制御に関わる食事要因の解明」とし、石川消化器内科において採取される潰瘍性大腸炎患者糞便を試料とし、①遺伝毒性物質コリバクチンの生合成遺伝子検出、②コリバクチン生産菌の単離・全ゲノム解析、③コリバクチンの定量解析を行う。一方、④同患者の生活習慣・食事内容調査を調査し、日本人潰瘍性大腸炎患者におけるコリバクチン保有率・食事要因の関連を解析するものである。本申請は平成29年3月24日に条件付承認を静岡県立大学学長より得た。さらに大腸粘膜の取得に関する研究倫理を申請しているところである。

#### 2. コリバクチン分析

理研より16種類の大腸菌株を購入した。また、コリバクチンを生産することが確かめられているNissle 1917も入手した。これらすべての菌株に対して全ゲノム解析を行った。解析の結果、Nissleをはじめとし、strain3および4にコリバクチン全生合成遺伝子群がコードされていることを確認することができた。続いて、コリバクチンの検出方法を確立すべく、培養液をLCHRMSで分析したところペプチダーゼCibPによって加水分解されたプロドラックモチーフ (*m/z* 343.2591) をstrain3, 4およびNissleのみから観測することに成功した。これによってコリバクチンの間接的観測方法を確立することができた。

### 3. コリバクチンの大腸発がんモデルの解析

静岡県立大学にて保有している三種のコリバクチン生産菌(Nissle 1917、菌株 3、菌株 4)についてマウス投与による発がん解析を検討する準備を行った。

[検討 1] コリバクチンの配列 (クラスター全長、各 gene 等) のデータベースを入手し、プライマー設計を行った。また、コリバクチンの配列を大腸菌以外の菌および種における相同性検索を実施中である。大腸菌以外に存在する場合は、大腸菌のみにしぼった研究から、対象を広げるべく研究計画の追加を提案する予定である。

[実験 2] In Vivo の検討の前に、個体における腸管上皮細胞の状態を反映していると考えられる、マトリゲルを用いた 3 次元培養の実験系を構築した。Min マウス腸ポリープ由来細胞の 2 次元における培養に成功し、現在も継代中である。この細胞を 3 次元培養したところ、細胞一層からなるオルガノイドを作成することに成功した。今後は腸管内腔を示すと考えられるオルガノイド内部にコリバクチン生産菌およびコリバクチンそのものを投与することにより、形態や mRNA 発現の変化を検討する予定である。

[実験 3] 最終的には三種のコリバクチン生産菌をマウスに生着させ、大腸発がんへの影響を観察することを目的としているため、まずは腸ポリープの多発する家族性大腸腺腫症のモデルマウス、Min マウスの糞便にコリバクチン産生菌がいるかを 20 週齢になるまで検討することにした。毎週、糞便を採取し、解析するためにサンプルを三好班員に郵送した。コリバクチン産生菌がない場合は、菌やコリバクチンそのものをマウスに投与する理想的な実験系になると思われる。また、コリバクチン産生菌がいた場合も腸ポリープ数とコリバクチン産生量との比較や、除菌した場合の腸ポリープ数とコリバクチン産生量との比較ができると考えている。

コリバクチン生産菌が生着するかを検討するために、生後 1 日目の仔鼠の肛門に菌を塗り付ける検討および口周囲に塗り付ける検討に代表される感染経路の検討を行う。生着の評価は糞便解析で行う予定であるため、コリバクチン生産菌に GFP を発現させるプライマーの設計を行った。個体としての評価であるが、表現系 (マウスの生死、健康状態 (便の状態・体重変化など)、腸管におけるがん化の評価、等々) の違いを観察する予定である。サンプル保存のためのレブコを購入した。

### 英文

Colibactins are natural products produced by select commensal, extraintestinal, and probiotic *Escherichia coli*. The biosynthetic enzymes responsible for the formation of products are encoded in a genome of *E. coli*. Based on the previous study, This class of natural products could be biosynthesized by a hybrid polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase gene cluster termed *clb*. Strains of *E. coli* possessing *clb* gene cluster induce DNA damage in eukaryotic cells and are thought to promote colorectal cancer formation. However, the chemical structure of colibactin as a final product has been covered yet.

To determine whether *E. coli* carrying *clb* is associated with human CRC (colorectal cancer) or IBD (inflammatory bowel disease), Arthur et al. screened mucosa-associated *E. coli* strains isolated from colorectal tissue specimens of 35 patients with IBD, 21 with CRC, and 24 non-IBD/non-CRC controls. CRC specimens could not be obtained from IBD associated CRC patients because these patients typically undergo colectomy upon diagnosis of dysplasia. Although 5 of the 24

(20.8%) non-IBD/non-CRC controls harbored *E. coli* carrying *clb*, the genotoxic island was detected in 14 of 35 (40%,  $P < 0.05$ ) IBD patients and in 14 of 21 (66.7%,  $P < 0.001$ ) CRC patients. This suggests that bacteria harboring *clb* are associated with chronic intestinal inflammation and CRC and may affect carcinogenesis.

In this study, we tried to isolate and characterize colibactin and biosynthetic precursor of colibactin from mutated *E. coli* Nissle 1917, which is colibactin producing strain. Spectroscopic analysis of chemical structures of precursors by using NMR, myristol-CoA connected with peptide has been isolated from deficiency of *clbP* (peptidase as a proposed function) mutant of *E. coli* Nissle 1917. Based on the biosynthetic gene cluster responsible for the formation of colibactin, these chemical structures were partially anticipated due to coding for the hybrid polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase in *clb*.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Kenji Watanabe, (招待講演) “Genetic indoctrination of *Escherichia coli* for finding genotoxins “colibactin” facilitating inflammation-induced colorectal cancer” US-Japan Cooperative Medical Sciences Program, 19th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Seoul, South Korea, 2017年2月7-10日 口頭発表 審査有, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当無し

(4) 特許出願

平成 29 年 4 月に AMED 知的財産部 湯浅様および前田様に本研究成果に関して特許出願をお願いしたところであり、現在特許性を調査中との回答を頂いています。