

平成 29 年 4 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460962

研究課題名(和文)大腸癌におけるコリバクチン産生性大腸菌の病原性の検討とスクリーニング法の開発

研究課題名(英文)Prevalence of colibactin positive E. coli in colorectal cancer patients

研究代表者

吉田 俊太郎 (Yoshida, Shuntaro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70598713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌発生に関連すると報告されているコリバクチン陽性大腸菌について、本邦における保菌率や特徴について検討した。大腸癌症例のコリバクチン陽性率は43%、コントロールでは46%であり頻度、相対濃度に差を認めなかった。コリバクチン陽性患者の大腸癌ではk-ras遺伝子変異例が認められたのに対し、コリバクチン陰性患者ではk-ras遺伝子は全例野生型であった。ほか、局在、進行度、カプセル内視鏡所見などの臨床像には有意な差を認めなかった。これらの結果からは海外からの既報と異なり、本邦の大腸癌、とくにk-ras野生型大腸癌の発生にはコリバクチン陽性大腸菌感染以外のメカニズムが重要である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Colorectal cancer (CRC) development is considered to be affected by luminal microbiota, and colibactin positive Escherichia coli (E. coli) is shown to be one of those microorganism from foreign studies. We examined the prevalence of colibactin positive bacteria in colonic lavage of CRC patients in Japan. We established DNA preparation method from colonic lavage and qualitative, quantitative detection method of colibactin (clbB) gene. Prevalence of colibactin positive bacteria was 43% in CRC cases, and 51% in control cases, providing no significant differences. In subgroup analysis of CRC cases, colibactin negative bacteria was associated with wild type k-ras gene, but not other clinicopathological factors. These results suggest that CRC in Japanese, especially k-ras wild CRC, may have different pathogenesis from CRC in other countries. Factors other than colibactin positive bacteria may be associated with the development of CRC in Japan.

研究分野：消化器癌

キーワード：大腸癌 大腸菌 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は我が国において増加著しい悪性腫瘍であり、年間死亡者数は約 50,000 人と悪性腫瘍のなかで第二位となった。ライフスタイルの欧米化が増加の一因であると考えられており、肥満、赤身の肉、運動不足、大腸癌の家族歴などが大腸癌の危険因子として知られている。肥満に伴うホルモンやサイトカインの産生異常、食事内容に含まれる発癌物質、遺伝子異常などが発癌に関連していると考えられているも不明である。大腸は個体のなかで最も細菌の多い臓器であり、 10^{14} 個の細菌が存在している。近年の腸内細菌叢の研究によって、これらの細菌叢が宿主の恒常性維持に関与しており、メタボリック症候群の患者で特定の菌種が増加していること、潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患の患者で別の細菌種が増加していることなどが報告されてきている。大腸癌と腸内細菌叢の関連はまだ報告が少ないが、マウスにおける大腸癌の発生には腸内細菌叢が必須であることが知られている。

大腸菌は腸内細菌叢の 0.1% 程度を占める菌種であり、特殊な病原性大腸菌 (O157 などの腸管出血性大腸菌、腸管侵入性大腸菌など) を除き、ほとんどは宿主にとって症状を発生しない常在細菌と考えられている。系統 B2 大腸菌は腸管内に感染している間は病気の原因とならない常在菌であるが、膀胱や尿管など腸管外の感染で病気を発生させる系統 (腸管外病原性大腸菌) である。この系統の大腸菌はコリバクチンという病原因子を有し、腸管上皮細胞との共培養によって細胞の DNA の切断をひきおこす遺伝子毒性をもつことが明らかにされている。また最近になり、コリバクチン陽性の腸内細菌がマウスの大腸癌の発生を促進することが報告され、ヒトにおいても関与している可能性が示唆されているが、本邦においてはその検討はされていない。

2. 研究の目的

ヒト大腸におけるコリバクチン陽性大腸菌の測定系を確立する。コリバクチン陽性大腸菌の大腸癌および正常患者の常在細菌叢における保有頻度、菌量を測定し、大腸癌との相関を検討する。コリバクチン陽性大腸菌保有患者における大腸癌の特徴を検討する。

3. 研究の方法

(1) 倫理委員会の承認のもと研究参加に承諾した患者の大腸内視鏡時に腸管洗浄液を採取し、細菌培養を行う。また腸管洗浄液から細菌 DNA を抽出した。培養した細菌を単コロニーで分離し、細菌 DNA を抽出した。これらの DNA をコリバクチン (clbB) 遺伝子、大腸菌の uidA 遺伝子、細菌共通の 16S rRNA 遺伝子のプライマーで PCR 法により増幅した。腸管洗浄液におけるコリバクチン陽性細菌検出法を確立し、患者の背景因子との相関

を検討した。コリバクチンの活性に影響をおよぼすコリバクチン P 遺伝子 (clbP) について単離した細菌 DNA よりダイレクトシークエンス法で決定し比較した。

(2) 上記研究で単離した大腸菌をヒト大腸癌由来細胞株 HT29 細胞に感染させ、上清中に分泌されるインターロイキンを測定した。

4. 研究成果

(1) コリバクチン陽性細菌検出法の確立
大腸検査施行時の腸管洗浄液から大腸菌を単離培養、細菌 DNA の抽出を行い、PCR 法によってコリバクチン遺伝子 (clbB) の陽性大腸菌株を分離した。コリバクチン産生に関わる pks genotoxic island 遺伝子群の別の遺伝子 (clbA, clbQ 遺伝子) についても陽性であることを確認した。この単離大腸菌を陽性コントロールとして clbB プライマーを用いた PCR 法による細菌検出感度を検討し、 1pg DNA/sample 、 1×10^4 CFU bacteria/ml の感度であった (図 1)。

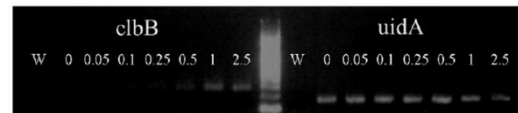


図1 コリバクチン陽性細菌DNA検出閾値の検討

(2) 腸管洗浄液の採取

研究参加の同意をいただいた患者の大腸内視鏡検査時に腸管洗浄液を採取し糞便内細菌 DNA を抽出した。患者背景、大腸疾患、DNA 濃度など表 1 に示す。大腸癌の症例は 35 例、また大腸に異常所見を認めないコントロールが 26 例であった。コントロールと比べ大腸癌症例の年齢は著変を認めなかったが、男性が多い集団であった。腸管洗浄液の細菌 DNA 量は疾患グループによって違いがみられなかった。

Disease	CRC	Adenoma	IBD	Control	Total
# of patients	35	37	6	26	104
Age (median)	69	69	43.5	66	68
(range)	(44 - 97)	(40 - 89)	(33 - 70)	(37 - 87)	(33 - 97)
<i>p</i>	<i>p</i> =0.223	<i>p</i> =0.191	<i>p</i> =0.059	-	-
Gender (%)	74.3	64.9	100	46.2	65.4
male	<i>p</i> =0.025	<i>p</i> =0.140	<i>p</i> =0.017	-	-
Total Bacterial DNA	5200	3300	3750	2600	3350
per Sample	(550 - 27000)	(510 - 20000)	(1800 - 8600)	(500 - 21000)	(500 - 27000)
(median; pg/ μ L)	<i>p</i> =0.249	<i>p</i> =0.922	<i>p</i> =0.483	-	-
(range; pg/ μ L)					

表1 患者背景

(3) 大腸内視鏡所見別コリバクチン陽性細菌保有頻度、細菌量の検討

上記で採取した DNA を用いて PCR 法で細菌数、大腸菌数、コリバクチン陽性細菌数、頻度を検討した。定性的 PCR でコリバクチン陽

性菌頻度(*pks* prevalence)を検討したところ大腸癌症例では、15/35、43%の陽性率であった。一方コントロールでは 12/26、46%であり頻度に差を認めなかった。大腸腺腫症例でも同様であった(表2)。

pks prevalence according to disease status.

Disease	<i>pks</i> -positive	<i>pks</i> -negative	Total	<i>pks</i> prevalence	<i>p</i>
CRC	15	20	35	43%	0.798
Adenoma	19	18	37	51%	0.685
IBD	1	5	6	17%	0.185
Control	12	14	26	46%	NA
Total	47	57	104	45%	

表2 大腸所見別コリバクチン陽性率

つぎに、所見別のコリバクチン陽性細菌の相対菌量について、16S rRNA の PCR で測定した全細菌量を標準として検討した。図2に示すようにいずれの疾患群でも大多数が腸内細菌の1%未満であり、大腸癌とコントロール症例でコリバクチン(*pks* 遺伝子)陽性細菌の相対菌量に有意差を認めなかった。

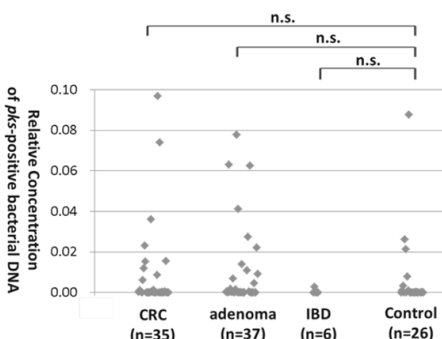


図2 大腸所見別コリバクチン陽性細菌の相対菌量

(4)大腸癌症例のサブグループ解析

大腸癌患者の腫瘍所見をもとにコリバクチン陽性例と陰性例を検討した。大腸癌の局在について盲腸、上行結腸、横行結腸の右側大腸癌ではコリバクチン陽性頻度は4/8で50%であった。一方左側大腸癌では8/19で42%であり、有意な差を認めなかった。つぎに大腸癌の主要な遺伝子変異であり、化学療法の選択方針に重要な影響を与える *k-ras* 遺伝子の変異について検討した。遺伝子検査を行った症例中 *k-ras* 遺伝子の野生型腫瘍は4例であり、いずれもコリバクチン陰性であった。一方 *k-ras* 遺伝子に変異をきたしていた腫瘍は6例であり、50%、3例でコリバクチンが

Subgroup	<i>pks</i> -positive	<i>pks</i> -negative	Total	<i>pks</i> prevalence
Right-sided CRC	4	4	8	50%
Left-sided CRC	8	11	19	42%
<i>ras</i> wild-type	0	4	4	0%
<i>ras</i> mutant-type	3	3	6	50%
Depth M or SM	3	2	5	60%
Depth MP or further	9	13	22	41%
Non-obstructed, Before treatment	7	5	12	58%
Non-obstructed, Under or after treatment	3	8	11	27%
Obstructed	5	7	12	42%

表3 大腸癌症例のサブグループ解析

陽性であった。統計学的に有意差は見られないものの、コリバクチン陽性細菌は大腸癌の *k-ras* 遺伝子変異に關与する可能性が示唆された。これら大腸癌症例のうちカプセル内視鏡による存在診断を検討した進行大腸癌 21 症例について検討した。コリバクチン陽性の症例では上行結腸癌 3 例や直腸癌 2 例を含む 8/10、80%でカプセル内視鏡による指摘が可能であった。一方コリバクチン陰性例では横行結腸癌 2 例や S 状結腸癌 2 例を含む 9/11、82%でカプセル内視鏡で指摘可能な病変であり、病変の描出されやすさに有意な影響をきたさないと考えられた。

(5)コリバクチン P 遺伝子の遺伝子配列

clbP の遺伝子配列についてダイレクトシークエンス法で検討した。患者より単離した 7 株のコリバクチン陽性大腸菌 (UT009SC, UT060SC, UT063SC, UT081SC, UT126SC, UT158SC, UT186SC) について 1515bp の *clbP* 遺伝子の配列決定を行った。結果 6 株はリファレンス遺伝子 (K12 substrain, MG1655) と完全一致であったが、UT081SC 株で Val (385) > Ala(385) の変異があることが分かった。疾患との関連は明らかではなかった。

(6)コリバクチン陽性大腸菌の IL-8 誘導能の検討

単離した大腸菌を用いて大腸癌由来細胞株 HT29 細胞からの IL-8 誘導能を検討した。コリバクチン陰性の 3 株は 10pg/ml-145pg/ml までの分泌を起こした。一方コリバクチン陽性の 3 株(UT060, UT063, UT081)はいずれも 70-90pg/ml の分泌を誘導したが、陰性の 3 株よりも有意に IL-8 を分泌することはなかった。

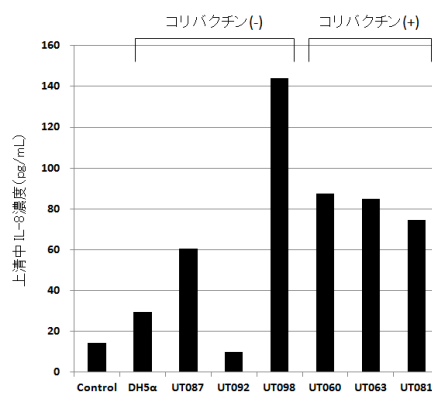


図3 単離大腸菌株によるIL-8誘導能の検討

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Ota Y, Yamada A, Kobayashi Y, Niikura R, Shimpoh T, Narita A, Yoshida S, Suzuki N, Watabe H, Hirata Y, Ishihara S, Sunami E,

Watanabe T, Koike K. Diagnostic capability of colon capsule endoscopy for advanced colorectal cancer: a pilot study. Digestive Endoscopy、査読有、2017 Mar 10. DOI: 10.1111/den.12862 PMID 28295697

DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.10.006.

吉田俊太郎、大腸癌 分子標的薬の使いかたと注意点、Medical Practice、査読なし、32 巻、2015、1819-1824

平田喜裕、大腸癌 予後改善をめざした大腸癌の総合実地診療 -、Medical Practice、査読なし、32 巻、2015、1737

神宝 隆行 (SHIMPOH TAKAYUKI)
東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 俊太郎 (YOSHIDA SHUNTARO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号： 70598713

(2) 研究分担者

平田 喜裕 (HIRATA YOSHIHIRO)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号： 10529192

(3) 研究協力者

太田 弓子 (OTA YUMIKO)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：