

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：10107

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06607

研究課題名(和文)腸内細菌由来抗腫瘍活性物質の同定とその認識機構および細胞シグナル活性化機構の解明

研究課題名(英文) Identification of probiotic derived bioactive molecule and clarification of its recognition system and activation mechanisms of cell signaling

研究代表者

小西 弘晃 (Konishi, Hiroaki)

旭川医科大学・医学部・客員助教

研究者番号：30777181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌の培養上清の中で最も強い癌細胞の増殖抑制効果を発揮したL.casei ATCC334の培養上清を繰り返し分離し、抗腫瘍活性物質フェリクロームを同定した。フェリクロームの抗腫瘍効果は5-FUやシスプラチンの効果を上回り、これらと併用することで相加効果が認められた。フェリクロームは小胞体ストレス経路を活性化させ抗腫瘍効果を発揮した。フェリクロームの立体構造に基づいた分子シミュレーションによりフェリクローム認識分子群を見出した。癌モデルマウスにフェリクロームを投与すると腫瘍増殖の抑制効果が発揮され、薬効が認められた10倍量を連日投与しても死亡個体はなく、血液検査値にも変化を及ぼさなかった。

研究成果の概要(英文)：Ferrichrome was identified from culture supernatant of L. casei ATCC334 which exhibited the strong growth inhibition effect of colorectal cancer cells. The anti-tumor effect of ferrichrome was stronger than classical anti-tumor agents, including 5-FU and cisplatin, and the additional effect was observed when ferrichrome and these agents were treated to cancer cells simultaneously. Ferrichrome activated the endoplasmic reticulum stress pathway for its anti-tumor effects. The molecular simulation based on structure of ferrichrome showed the molecular targets of ferrichrome. Ferrichrome exhibited tumor suppressive effects in tumor model mice. The adverse events, including lethality, hepatic dysfunction and anemia, were not observed when tenfold of medicinal dose of ferrichrome was administrated daily for a week.

研究分野：生物学

キーワード：大腸癌 プロバイオティクス 腸内細菌 癌治療

1. 研究開始当初の背景

大腸癌患者では、健常人とは異なる腸内細菌叢を呈することが多く (Marchesi JR, PLoS One, 2011) (Sobhani I, PLoS One, 2011)、癌の発育・進展に腸内細菌の異常が深く関わっていると考えられている。また、基礎的検討においてはプロバイオティクスなどの腸内細菌を摂取することで腸内細菌叢の正常化や抗腫瘍効果など有益な作用がもたらされることが知られている (Isolauri E, J Clin Gastroenterol, 2008) (Kalliomäki M, Lancet, 2001) (Rowland IR, Carcinogenesis, 1998)。これらの腸内細菌は、機能性食品などに用いられており、その安全性が担保されていることから、有害事象が極めて低い抗腫瘍薬としての臨床応用が期待されてきた。しかし、これら腸内細菌の抗腫瘍活性は、培養条件の差によって生じる作用の不安定性 (Miao L, World J Microbiol Biotechnol, 2013) や宿主腸内細菌叢などの腸内環境の個体差 (DuPont AW, Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011) (Femia AP, Carcinogenesis, 2002) などの影響を受けるため、臨床的に抗腫瘍効果が証明された報告はなかった。

2. 研究の目的

腸内細菌の抗腫瘍活性を仲介する菌由来物質を用いることで、安定した抗腫瘍効果が発揮でき、かつ安全性の高い抗腫瘍薬の開発が期待される。本研究では腸内細菌由来の新規抗腫瘍活性物質を同定し、癌細胞における認識機構や抗腫瘍効果の発現機序を解明することで腸内細菌由来物質を用いた創薬研究へつなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腸内細菌由来の抗腫瘍活性物質の同定  
種々の腸内細菌の培養上清を大腸癌細胞株に処置し、抗腫瘍活性物質を産生する腸内細菌を選別する。続いて、選別した培養上清を分離し、細胞増殖抑制能を目安に分画を選別する。HPLC 解析により単一ピークが認められる分画に存在する物質を質量分析解析により決定する。

(2) 抗腫瘍活性物質の作用メカニズムの解明  
大腸癌細胞に (1) で同定した抗腫瘍活性物質を投与し、細胞シグナル関連分子の活性変化解析および mRNA の網羅的発現解析を行う。続いて、計算化学的手法に基づく抗腫瘍活性物質の分子シミュレーションから抗腫瘍活性物質を認識する分子を決定する。

(3) 癌モデルマウスでの抗腫瘍活性物質による抗腫瘍効果の検討

大腸癌モデルマウスに抗腫瘍活性物質を投与し、抗腫瘍効果を検討する。また、抗腫瘍活性物質をマウスに処置した際の安全性を評価する。

4. 研究成果

(1) 乳酸菌由来の抗腫瘍活性物質フェリクロームの同定

種々の腸内細菌の培養上清を回収して大腸癌細胞に処置した。最も強い癌細胞の増殖抑制効果を発揮した L.casei ATCC334 培養上清を HPLC により繰り返し分離し、最終的に HPLC スペクトラムがシングルピークを示す抗腫瘍活性物質含有分画を回収した。続いて質量分析解析により、抗腫瘍効果を発揮する責任分子がフェリクロームであることを明らかにした (Konishi H, Nat Commun, 2016)。また、フェリクロームの抗腫瘍効果はアポトーシス誘導により生じていることを明らかにした。さらに、フェリクロームの抗腫瘍効果は in vitro 試験において既存抗癌剤であるフルオロウラシル (5-FU) やシスプラチンの効果を上回り、これらと併用することで相加効果が認められた。

SW620

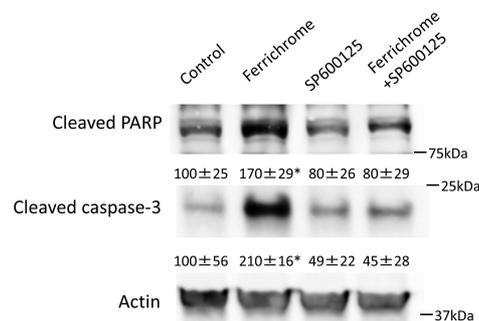
% of growth inhibition

	24hr	48hr	72hr
Ferrichrome	42.3±9.6	90.7±3.4	99.2±3.0
5-FU	22.4±13.7	47.7±7.3	56.5±6.3
Cisplatin	15.9±8.6	30.3±5.3	53.5±2.6

(2) フェリクロームの作用メカニズムの解明

シグナルパスウェイ解析

フェリクロームを大腸癌細胞に処置し、MAPK シグナル解析を行った。フェリクロームを処置した細胞では JNK シグナルの活性化が生じていることおよび JNK シグナルの阻害により抗腫瘍効果が減弱することから、JNK シグナルの活性化に起因する癌細胞のアポトーシスの誘導がフェリクロームの抗腫瘍効果に必須であることを明らかにした。続いて、トランスクリプトーム解析を行うことで、JNK-DDIT3 シグナル活性化に起因する小胞体ストレスの誘導がフェリクロームの抗腫瘍効果に必須であることを明らかにした (Konishi H, Nat Commun, 2016)。



### フェリクローム認識分子の同定

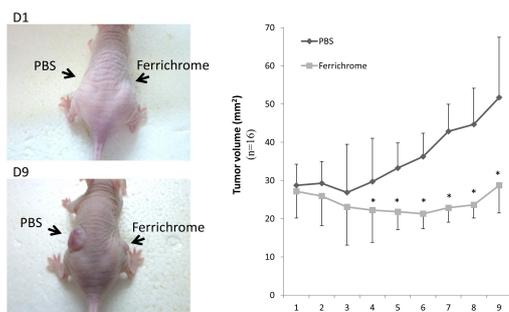
フェリクロームのひずみエネルギー100kcal/mol 以内の構造を計算化学的手法に基づき取得してPDB データベースに登録された分子に対して網羅的にドッキングシミュレーションを行うことで、フェリクローム認識分子群を見出した (Ijiri M, Konishi H, Tumor Biol, 2017)。

### フェリクローム中の抗腫瘍効果に必須の構造の同定

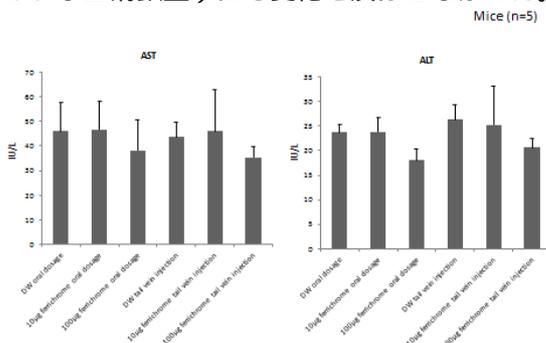
フェリクロームの分子構造中に存在している枝構造を金属分子の付加により自由度を制限したところ抗腫瘍効果の減弱が認められた。また、フェリクローム処置により細胞内鉄量の減少が認められたが、フェリクロームの抗腫瘍効果は細胞内鉄量の変化と関連がなかった。よって、フェリクロームが金属分子とキレート形成するために必要となる枝構造がフェリクローム認識分子と相互作用することで、フェリクロームによる抗腫瘍効果が得られることを明らかにした (Ijiri M, Konishi H, Tumor Biol, 2017)。

### (3) 癌モデルマウスでの抗腫瘍効果

癌細胞移植モデルマウスにフェリクロームを腫瘍に直接あるいは腹腔内に連日投与すると腫瘍増殖の抑制効果が発揮されることを明らかにした。またフェリクロームの抗腫瘍効果は化学発癌モデルマウスに対する経口投与および腹腔内投与において確認された。



さらに、フェリクロームを癌細胞移植モデルで薬効が認められた 10 倍量を連日マウス腹腔内および尾静脈経路より投与しても死亡個体は認められず、血液検査値 (肝機能障害および血清鉄量) にも変化を及ぼさなかった。



### <引用文献>

Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WH, Roelofs R, Boleij A, Tjalsma H. Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLoS One*. 2011;6(5):e20447

Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, Corthier G, Tran Van Nhieu J, Furet JP. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One*. 2011 Jan 27;6(1):e16393.

Isolauri E, Salminen S; Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology, and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group Report. Probiotics: use in allergic disorders: a Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology, and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group Report. *J Clin Gastroenterol*. 2008 Jul;42 Suppl 2:S91-6.

Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2001 Apr 7;357(9262):1076-9.

Rowland IR1, Rumney CJ, Coutts JT, Lievense LC. Effect of Bifidobacterium longum and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*. 1998 Feb;19(2):281-5.

Miao L, Wang X, Jiang W, Yang S, Zhou H, Zhai Y, Zhou X, Dong K. Optimization of the culture condition for an antitumor bacterium *Serratia proteamacula* 657 and identification of the active compounds. *World J Microbiol Biotechnol*. 2013 May;29(5):855-63.

DuPont AW1, DuPont HL. The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011 Aug 16;8(9):523-31.

Femia AP1, Luceri C, Dolara P, Giannini A, Biggeri A, Salvadori M, Clune Y, Collins KJ, Paglierani M, Caderni G. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*. 2002 Nov;23(11):1953-60.

### 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3件)

Goto T, Fujiya M, Konishi H (共同筆頭著者), Sasajima J, Fujibayashi S, Hayashi A, Utsumi T, Sato H, Iwama T, Ijiri M, Sakatani A, Tanaka K, Nomura Y, Ueno N, Kashima S, Moriichi K, Mizukami Y, Kohgo Y, Okumura T. An elevated expression of serum exosomal microRNA-191, -21, -451a of pancreatic neoplasm is considered to be efficient diagnostic marker, BMC Cancer, 18(1):116, 2018

Ijiri M, Fujiya M, Konishi H (共同筆頭著者), Tanaka H, Ueno N, Kashima S, Moriichi K, Sasajima J, Ikuta K, Okumura T. Ferrichrome identified from, Lactobacillus casei ATCC334, induces apoptosis through its iron binding site in gastric cancer cells, Tumour Biol, 39(6):1010428317711311, 2017

Konishi H, Fujiya M, Tanaka H, Ueno N, Moriichi K, Sasajima J, Ikuta K, Akutsu H, Tanabe H, Kohgo Y. Probiotic-derived ferrichrome inhibits colon cancer progression via JNK-mediated apoptosis, Nat Commun, 7:12365, 2016

〔学会発表〕(計2件)

Konishi H, Fujiya M, Ijiri M, Tanaka K, Fujibayashi S, Goto T, Kashima S, Ando K, Takahashi K, Ueno N, Sasajima J, Moriichi K, Tanaka H, Ikuta K, Okumura T, Ferrichrome, a tumor suppressive molecule derived from Lactobacillus casei, inhibits the progression of colorectal cancer via the endoplasmic reticulum stress pathway, Digestive Disease Week, 2017(シカゴ)

Goto T, Konishi H, Sasajima J, Fujibayashi S, Utsumi T, Sssto H, Sugiyama Y, Iwama T, Ijiri M, Takahashi K, Tanaka K, Sakatani A, Nomura Y, Ueno N, Kashima S, Takauji S, Moriichi K, Fujiya M, Okumura T, Serum Exosomal microRNA-191, -21, -451A are Efficient Diagnostic Marker of Pancreatic Neoplasm, 47th Annual Meeting of the American Pancreatic Association, 2016 (ボストン)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: 抗腫瘍剤

発明者: 藤谷幹浩、小西弘晃、盛一健太郎

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2016-9224 号

出願年月日: 平成 28 年 1 月 20 日

国内外の別: 国内

名称: 抗腫瘍剤

発明者: 藤谷幹浩、小西弘晃、盛一健太郎

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/1803

出願年月日: 平成 29 年 1 月 19 日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 弘晃 (KONISHI, Hiroaki)

旭川医科大学・医学部・客員助教

研究者番号: 30777181