

博士論文

論文題目 ヒト腸管内の大腸菌と大腸癌・腺腫の関連に関する研究

氏 名 神宝 隆行

ヒト腸管内の大腸菌と  
大腸癌・腺腫の関連に関する研究

東京大学大学院医学系研究科 内科学専攻

指導教員 小池和彦教授

神宝 隆行

# 目次

	頁
目次	2
要旨	3
序文	4
目的	10
方法	11
結果	25
考察	45
結語	55
謝辞	56
引用文献	57

## 要旨

近年、*pks island* という遺伝子群を有する大腸菌の大腸癌発癌への関与が、*in vitro* と *in vivo* で示唆されている。また海外でのヒト大腸組織の検討で、大腸癌症例で *pks* 陽性大腸菌を有する症例の割合が高かった。

今回、便あるいは腸管洗浄液を用いて *pks* 陽性細菌の有無・菌量を PCR 法で検討する方法を確立し、本邦の 172 症例から採取した腸管洗浄液を検討したところ、*pks* 陽性細菌を有する症例の割合は大腸癌で 37%、腺腫で 44%、Control で 42%と有意差を認めなかった。*pks* 陽性症例では *pks* 陽性細菌の定量も行なったが有意差はなかった。

また腸管洗浄液から分離した *pks* 陽性細菌株で、*pks island* の生理活性に重要と考えられる *clbP* 遺伝子の DNA 配列の多型を検討し、7 検体中 6 検体で同一配列であった。

## 序文

ヒト大腸内には少なくとも 1000 種以上、 $10^{14}$  個以上という莫大な数の細菌が常在しており<sup>1</sup>、これら腸内の細菌を総称して腸内細菌叢 (gut microbiota) と呼称する。腸内細菌叢を構成する細菌の大部分は宿主であるヒトと共生関係にある一方、一部の細菌は宿主に有害な作用を示し病原性細菌として扱われる。近年、腸内細菌叢の変化が関与していると考えられている疾患は、炎症性腸疾患<sup>2</sup>、過敏性腸症候群<sup>3</sup>、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) 起因性腸炎<sup>4</sup>、肝疾患<sup>5</sup>、肥満<sup>6</sup> など多岐にわたる。

大腸癌の発症にも腸内細菌叢の変化が関与していると考えられており、以下に挙げる菌種で大腸癌との関連が示唆されている。*Fusobacterium nucleatum*<sup>7-11</sup>、*Streptococcus gallolyticus*<sup>12</sup>、enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*<sup>13</sup>。これらと共に、大腸菌 (*Escherichia coli* ; 以下 *E. coli* と略記) も大腸癌との関連を疑われている。

*E. coli* はプロテオバクテリア門; ガンマプロテオバクテリア綱; 腸内細菌目; 腸内細菌科 (Family *Enterobacteriaceae*) ; *Escherichia* 属に属する通性嫌気性のグラム陰性桿菌で、爬虫類・鳥類・哺乳類の消化管にしばしば常在している。特にヒト腸管での陽性率は 90% を超え、腸内細菌科細菌の中では最も多く分離される菌種である。臨床的に、ヒトから分離される *E. coli* 株は腸管内に常在する非病原性株の他、腸炎の原因となる腸管病原性株、尿路感染・菌血症・新生児髄膜炎等の原因となる腸管外病原性株 (extraintestinal pathogenic *E. coli* ; ExPEC) に大別される。また、*E. coli* の系統分

類では 1984 年に Ochman, Selander らが提唱した *E. coli* reference collection (ECOR) が広く使用されており、*E. coli* の大部分は A, B1, B2, D いずれかの phylogenetic group に属する<sup>14</sup>。phylogenetic group B2 に属する *E. coli* は他の group と比較して ExPEC が多く、腸管外病原性に関連する遺伝子 (virulence gene : *pap*, *sfa/foc*, *afa*, *hly*, *cnf1*, *aer*, *ibeA* 等) を有する株が多く<sup>15</sup>、一方で抗菌薬に対する耐性は比較的低いことがこれまでに知られている<sup>16</sup>。

2004 年、Martin らは、ヒトの大腸癌 21 症例と Control (大腸癌および炎症性腸疾患でない) 24 症例の大腸組織検体 (大腸癌症例では癌組織検体) を入手し、それらの粘膜表面あるいは粘膜組織内から好気条件下の MacConkey 培地上で細菌が培養されてくるかどうかを検討した。結果、Control 症例ではそれぞれ 42%・29% が培養陽性であったのに対し大腸癌症例ではそれぞれ 71%・57% が培養陽性であり、大腸癌症例の組織から細菌がより高率に検出される傾向がある ( $p<0.001$ ,  $p=0.058$ ) ことを報告した。いずれも検出された中で最も多かった菌種が *E. coli* で過半数を占め、粘膜組織内の *E. coli* に限定した検討では、大腸癌症例の癌組織で 33% 陽性、非癌組織で 14% 陽性、Control 症例の組織で 9% と、大腸癌組織内から *E. coli* がより高率に検出される ( $p=0.036$ ) ことが示された。<sup>17</sup>

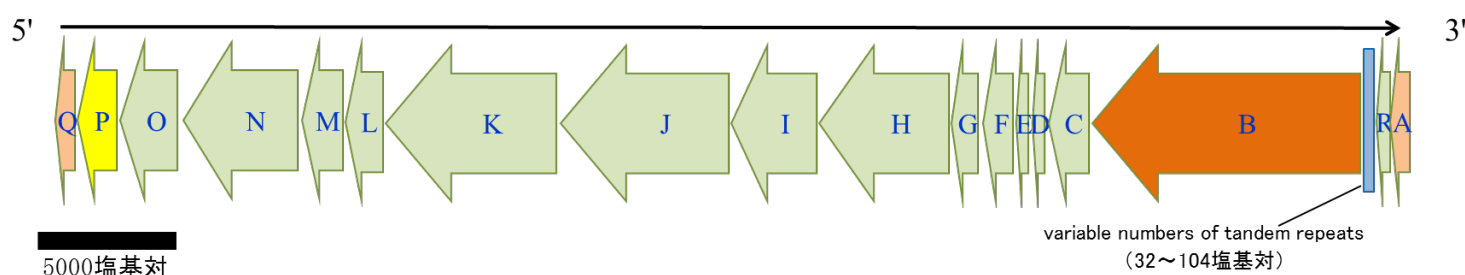
続いて 2006 年、Nougayrède らは、新生児髄膜炎の起炎菌として分離された ExPEC 株である IHE3034 が、複数の哺乳類体細胞株との *in vitro* での共培養試験において、

宿主細胞の細胞分裂を阻害して巨細胞化を引き起こすことを報告した。この現象はこの *E. coli* 株の生菌と宿主細胞との間に直接の接触が起こる場合にのみ観察され、mutation transposon の解析から、この *E. coli* 株がゲノム上に有する *pks* island と呼ばれる遺伝子群 (全長約 54000 塩基対) がこの性質に関与しており、これを欠失させると上述した細胞毒性を喪失すること、逆に非病原性 *E. coli* 株 (DH10B) に *pks* island を形質導入すると上述の細胞毒性を獲得することも示された。さらに、*pks* 陽性 *E. coli* 株と共培養された (ヒトを含む) 哺乳類体細胞を解析したところ、DNA 二重鎖切断・DNA 修復機構活性化・細胞周期停止が起こっていることが示唆された。<sup>18, 19</sup>

*pks* island とは、図 1 に示すような一連の遺伝子群 (全長約 54000 塩基対; *E. coli* ゲノム全体の約 1%) を指しており、この領域に 3 個の nonribosomal peptide megasynthases (NRPS) (*clbH*, *clbJ*, *clbN*)、3 個の polyketide megasynthases (PKS) (*clbC*, *clbI*, *clbO*)、2 個の hybrid NRPS/PKS megasynthases (*clbB*, *clbK*) などを含んでいる。なお polyketide とは、アセチル CoA を出発物質とし、マロニル CoA を伸長物質として生成されたポリケトン鎖を有する化合物を指しており、生成過程は脂肪酸のそれと類似しているがカルボニル基の還元反応を伴わない点が異なっている<sup>20</sup>。細菌や真菌の多くがその生成酵素 (polyketide synthase) を有している。polyketideの中には抗菌薬 (エリスロマイシン、テトラサイクリン)、抗真菌薬 (アンホテリシン B)、HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (ロバスタチン) などとして医療応用されている物質も存在する。*pks*

island にコードされた各酵素によって生成される最終産物はペプチドと polyketide の複合体であると推測されており、colibactin と命名されているが、その分離精製にはいまだ成功していない。宿主細胞を *pks* 陽性 *E. coli* 株の培養上清のみ、あるいは溶菌液のみに曝露させた場合や、宿主細胞と *pks* 陽性 *E. coli* 株の間に  $0.2\ \mu\text{m}$  厚の透過性膜を置いた場合には上述した細胞毒性が確認されないことから<sup>18</sup>、colibactin は極めて不安定な物質であり、細菌と宿主細胞が直接接触する場合にのみ宿主細胞に到達できるものと推測される。*pks* island を構成する各遺伝子につき、他菌種の酵素遺伝子との相同性を調べたり、それぞれの遺伝子に変異した *E. coli* 株で増加する中間生成物を単離解析するなどの方法で、徐々にその生成過程が明らかになりつつある<sup>21</sup>。

図 1. *pks* island の構成



[凡例] A: *clbA* 遺伝子、 B: *clbB* 遺伝子、 以下同様

*pks* island の一部である *clbP* 遺伝子(全長 1515 塩基対)のコード蛋白 ClbP は 3 箇所の細胞膜貫通型のらせん構造と細胞膜外(periplasm)に存在するペプチダーゼを



有し、periplasm に分泌された colibactin 前駆物質がペプチダーゼ活性により分解されることで活性型の colibactin が生成されると推定されている<sup>22, 23</sup>。CibP もいまだ分離精製されていないが、理論上の CibP の立体構造が推定されており、活性中心は 95 番目セリン残基で、これを  $\beta$  スtrand 構造 (327~330 番目アミノ酸残基) および 186 番目チロシン残基が取り囲む形態であるとされている。実際に、この推定された活性中心に結合して活性を阻害するよう設計されたホウ素含有低分子化合物を培地に添加すると、上述の *pks* 陽性 *E. coli* 株が細胞毒性をほぼ完全に喪失することも示された<sup>24</sup>。

*pks* island を有する *E. coli* 株は全て ExPEC あるいは非病原性株であり、腸管病原性株で *pks* island を有するものは知られていない<sup>18, 25, 26</sup>。また、*pks* island を有する *E. coli* 株は全て phylogenetic group B2 に属するとする報告が多いが<sup>18, 25, 27</sup>、phylogenetic group B1 に属する *E. coli* や *E. coli* 以外の腸内細菌科細菌 (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter koseri*) にも *pks* island を有する株が少数報告されている<sup>26</sup>。

*in vivo* でも *pks* 陽性 *E. coli* 株の細胞毒性に関する検討がなされた。2012 年、Arthur らは、無菌環境下で大腸炎モデルマウス (IL10<sup>-/-</sup>) に発癌物質 azoxymethane と *pks* 陽性 *E. coli* 株を経口投与して大腸炎を発症させたところ高率に大腸癌を合併すること、azoxymethane と *pks* 陰性 *E. coli* 株の投与では同程度の大腸炎を発症するものの大腸癌は発症しないこと、また *pks* 陽性 *E. coli* 株を投与されたマウスの腸管上皮細胞では

上述の *in vitro* での報告と同様、DNA 二重鎖切断・細胞周期停止が見られることを報告した。同時に、ヒト大腸組織検体の検討を行ない、大腸癌症例での *pks* 陽性 *E. coli* 株保有率 (*pks* 陽性 *E. coli* 株を保有している症例の割合) が 67% と、Control 症例 (21%) と比較して有意に高い ( $p < 0.001$ ) ことも報告した。<sup>28</sup> ヒト大腸組織検体を用いた *pks* 陽性 *E. coli* 株保有率の検討としては、Buc らも翌 2013 年に同様の報告をしている (大腸癌 55%; Control 19%;  $p < 0.01$ )<sup>27</sup>。

ヒトにおける *pks* 陽性 *E. coli* 株保有率と大腸癌の関連を検討した上述の報告はいずれも欧米諸国のもので、数十名の症例から開腹手術あるいは内視鏡下生検で得られた大腸組織検体を用いたものであるが、本邦の症例で同様の検討を行なった報告はなく、また、便検体を用いた同様の検討もない。欧米諸国と人種や生活習慣の異なる本邦において、また、大腸組織と異なり非侵襲的に入手できる便や内視鏡検査時の腸管洗浄液を用いて、*pks* 陽性細菌保有率と大腸癌の関連を検討することは有意義であると考えた。

また前述の通り、ClbP は colibactin 生成の最終過程に関与することで *pks* 陽性 *E. coli* の細胞毒性と強く関連していると考えられ、大腸癌予防に関連して今後の創薬ターゲットたり得るなど、さらなる研究の余地が想定される。しかし、その DNA 配列の多型につき、臨床的に入手された細菌 DNA を用いて具体的に検討した報告はない。そこで、本研究で入手した *pks* 陽性細菌 DNA を用い、*clbP* 遺伝子の多型を検討した。

## 目的

- I. 腸管洗浄液および便を用いた *pks* 陽性細菌検出法の確立
- II. *pks* 陽性細菌保有率と大腸癌の関連の検討
- III. *clbP* 遺伝子の多型の検討

## 方法

### I. 腸管洗浄液および便を用いた *pks* 陽性細菌検出法の確立

#### 便・腸管洗浄液の採取

当院受診症例の便、あるいは診断・治療上の必要により実施される下部消化管内視鏡検査で大腸内から採取される腸管洗浄液を解析に用いた。検体採取時、受診者本人に口頭および文書で研究概要を説明し、文書で同意を確認した。本研究は当院の倫理委員会で 2013 年 12 月に承認された(審査番号:10329)。

下部消化管内視鏡検査の前処置として、受診者は検査前日 21 時以降は飲水のみを許可され、検査当日朝 8 時から経口腸管洗浄剤(商品名:ニフレック)を水 2L に溶解して内服し、排便が半透明～透明かつ水様となったことを確認後、13~17 時に下部消化管内視鏡検査を施行された。ただし一部の症例における下部消化管内視鏡検査は、大腸癌あるいは他臓器癌大腸浸潤による大腸閉塞への精査治療目的で施行され、前処置が省略あるいは大幅に簡略化されたため、解析に際しては別個に取り扱った(後述)。

内視鏡検査中、大腸内腔に残存している腸管洗浄液 10mL 程度を、内視鏡の鉗子口に取り付けたシリンジで手動的に採取した。採取された腸管洗浄液は一時冷蔵された上で、次項に述べる方法で処理された。

### 腸管洗浄液からの細菌分離

採取された腸管洗浄液は遠心処理(8000rpm, 3min)後、上清を廃棄し、ペレットを Phosphate Buffer Saline(以下 PBS) 5mL 内で懸濁後、再度同様に遠心処理し、上清廃棄・ペレット懸濁・遠心処理・上清廃棄を行なった上で、最終的に得られたペレットを PBS 3mL に懸濁したものを解析対象とした。このうち 1mL を後述する DNA 抽出処理に用い、別の 100  $\mu$  L を適宜 PBS で希釈後、寒天培地(LB Agar, Lennox (240110))に接種し好気条件下で 37°C・12~20 時間培養してコロニー数を目視計測することで腸内細菌科細菌数の算出に用い、残りをグリセロール(終濃度 20%)内に懸濁して-30°C で冷凍保存した。

### 腸管洗浄液からの細菌 DNA 抽出

腸管洗浄液を上述の方法で処理後、その 1mL を用い、QIAamp DNA Stool Mini Kit(QIAGEN)をメーカーマニュアル通りに用いて細菌 DNA を抽出した。

### 単一菌株の分離・培養・DNA 抽出

前述の腸内細菌科細菌数計測に用いた寒天培地上の個別のコロニーから釣菌し、液体培地(LB Broth, Lennox (240230))で 37°C・16~24 時間培養後、SepaGene(エー

ディア)をメーカーマニュアル通りに用いて細菌 DNA を抽出した。

#### 便からの細菌 DNA 抽出

便検体は採取後速やかに冷蔵保存され、下記の方法で処理された。

検体は計量後、うち 100mg を用い、QIAamp DNA Stool Mini Kit をメーカーマニュアル通りに用いて細菌 DNA を抽出した。

#### DNA の解析 (Conventional PCR 法、qPCR 法)

得られた細菌 DNA は、入手した腸管洗浄液中の全細菌の DNA の混合物である。

これを Conventional PCR (polymerase chain reaction)法および Real-time quantitative PCR 法(qPCR 法)で解析し、*pks* 陽性細菌 DNA の有無・菌量を検討した。

#### PCR の詳細

PCR において、表 1 に示す 4 種類のプライマー・ペア(*clbB*-F,R、*uidA*-F,R、*EntrbFam*-F,R、*16S-Univ*-F,R)を、それぞれ、*pks* 陽性細菌 DNA、*E. coli* DNA、腸内細菌科細菌 DNA、全細菌 DNA の検出に用いた。

表 1. PCR に用いたプライマー・ペア (1)

プライマー		PCR 産物の サイズ(塩基対)	出典
clbB-F	GCGCATCCTCAAGAGTAAATA	283	Arthur, 2013
clbB-R	GCGCTCTATGCTCATCAACC		
uidA-F	TGGTAATTACCGACGAAAACGGC	147	Tantawiwat, 2005
uidA-R	ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG		
EntrbFam-F	TGCCGTAACTTCGGGAGAAGGCA	426	Atarashi, 2011
EntrbFam-R	TCAAGGACCAGTGTTCAAGTGTC		
16S-Univ-F	GGTGAATACGTTCCCGG	144	Kostic, 2013
16S-Univ-R	TACGGCTACCTTGTTACGACTT		

Conventional PCR 法:

耐熱性 DNA ポリメラーゼとして pol I 型の AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) をメーカーマニュアル通りに用い、DNA サンプル液 1  $\mu$  L を含む総量 20  $\mu$  L のサンプル液を調製して PCR に供した。サーマルサイクラーとして MyCycler あるいは T100 Thermal Cycler (BIORAD) を用い、下記のプロトコルを使用した。

95°C, 7min → (95°C, 30sec – 55°C, 30sec – 72°C, 30sec) × 35cycles →  
→ 72°C, 7min → 4°C

PCR 後のサンプルより 10  $\mu$  L を採取し、臭化エチジウムを含むアガロース・ゲル内で電気泳動を施行し、紫外線ランプ下で DNA バンドを観察した。

なお、DNA サンプルからの菌種同定や遺伝子シーケンシングのために PCR を行なう場合は、より精確性の高い DNA 複製を行なうため、pol I 型・ $\alpha$  型混合の耐熱性 DNA ポリメラーゼとして LA Taq with GC Buffer (TaKaRa) をメーカーマニュアル通りに使い、DNA サンプル液 1  $\mu$  L を含む総量 20  $\mu$  L のサンプル液を調製して PCR に供し、下記のプロトコルを使用した。

95°C, 7min  $\rightarrow$  (95°C, 30sec – 55°C, 30sec – 72°C, 120sec)  $\times$  35cycles  $\rightarrow$   
 $\rightarrow$  72°C, 7min  $\rightarrow$  4°C

qPCR 法:

耐熱性 DNA ポリメラーゼとして pol I 型由来の FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche) メーカーマニュアル通りに使い、DNA サンプル液 2  $\mu$  L を含む総量 20  $\mu$  L のサンプル液を調製して PCR に供した。サーマルサイクラーとして StepOnePlus (BIORAD) を使い、下記のプロトコルを使用した。

95°C, 10min  $\rightarrow$  (95°C, 15sec – 60°C, 60sec)  $\times$  40cycles  $\rightarrow$   
 $\rightarrow$  95°C, 15sec  $\rightarrow$  60°C, 60sec  $\rightarrow$  [dissociation phase]  $\rightarrow$  95°C

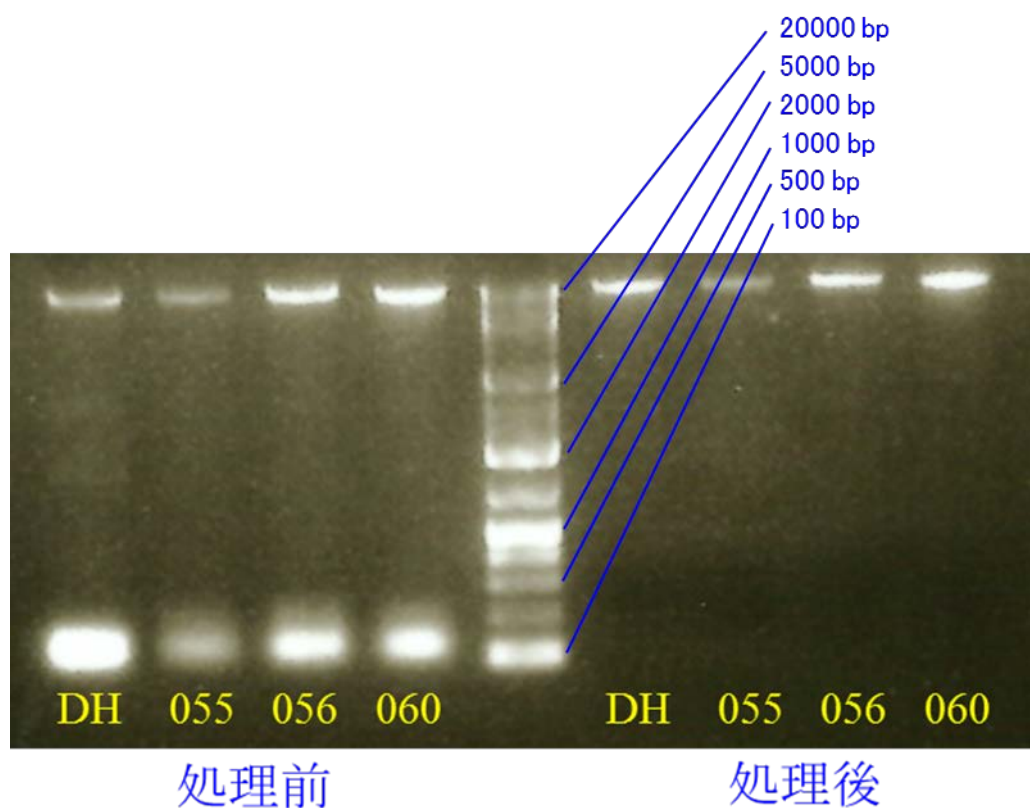
Conventional PCR、qPCR とともに、*pks* 陽性細菌 DNA の陰性コントロールとして実験用の *pks* 陰性 *E. coli* 株 (DH5  $\alpha$ ) DNA を、また陽性コントロールとしてヒト腸管洗



浄液検体由来の単一 *E. coli* 株から抽出した DNA (UT060SC-DNA) を使用した。

UT060SC-DNA は、表 2 に示した 4 種類のプライマー・ペアによる PCR 産物それぞれを、アガロース・ゲル内での電気泳動、および Sanger 法による DNA シークエンシング (ユーロフィンジェノミクス株式会社に委託) で確認済みである。

なお、DNA 量の絶対定量が必要な場合は、陰性コントロールとしてヒト腸管洗浄液検体由来の単一 *E. coli* 株から抽出した DNA (UT056SC-DNA) を DH5  $\alpha$  DNA の代わりに用いた。これは、各検体中の RNA 混入量をリボヌクレアーゼ (ニッポンジーン) による 37°C・1 時間の処理とアガロース・ゲル電気泳動で評価したところ、UT056SC-DNA 検体および UT060SC-DNA 検体では RNA 混入量が全核酸量の 20% 以下と充分少なかったのに対し、DH5  $\alpha$  DNA では 80% 以上と多く、分光光度計による全核酸量の定量値をそのまま DNA 量の代替として扱うことが困難であったためである (図 2)。



Gene Ladder Wide 1  
(0.1 - 20kbp)

DNA サイズ	DNA量 5 $\mu$ l	
20,000 bp	100 ng	
10,000 bp	50 ng	
7,000 bp	35 ng	
5,000 bp	75 ng	
4,000 bp	40 ng	
3,000 bp	30 ng	
2,000 bp	100 ng	
1,500 bp	30 ng	
1,300 bp	26 ng	
1,000 bp	100 ng	
700 bp	35 ng	
500 bp	75 ng	
400 bp	40 ng	
300 bp	30 ng	
200 bp	20 ng	
100 bp	100 ng	

図2. DNA 検体に混入した RNA 量の半定量的検討

[凡例] DH: DH5 $\alpha$  DNA 検体、055: UT055SC-DNA 検体

056: UT056SC-DNA 検体、060: UT060SC-DNA 検体

[備考] DNA 分子量マーカーの各バンドに含まれる DNA 量を共に示す(メーカー作成)。

### Conventional PCR における *pks* 陽性細菌 DNA の検出閾値の検討

*pks* 陽性細菌 DNA の有無をプライマー・ペア clbB-F,R を用いた Conventional PCR で調べるに当たり、*pks* 陽性細菌 DNA の検出閾値をあらかじめ確認することとした。

*pks* 陰性コントロールとして UT055SC-DNA、*pks* 陽性コントロールとして UT060SC-DNA を用い、両者を合計 DNA 量が 500pg になるよう種々の割合で混合した。これらに対しプライマー・ペア clbB-F,R を用いた Conventional PCR を行ない、陽性と判定される最小の UT060SC-DNA 量を求めた。

### PCR に使用したプライマーの妥当性判定

PCR で *pks* 陽性細菌 DNA を検出するためにプライマー・ペア clbB-F,R を用いた場合、PCR 産物のサイズは 283 塩基対であり、*pks* island 全体(約 54000 塩基対)の約 0.5%を占めるに過ぎない。clbB-F,R を用いた PCR で陽性と判定された DNA 検体が *pks* island 全長を有していることを確認するため、以下の方法を用いた。

前述の方法で腸管洗浄液由来の単一菌株 DNA を入手し、この中から、いずれも別個の症例由来で、かつプライマー・ペア clbB-F,R を用いた Conventional PCR で *pks* 陽性と判定された 4 株 (UT009SC01, UT060SC, UT063SC, UT081SC) の DNA を検討に用いた。それぞれにつき、表 2 に示す 2 種類のプライマー・ペアを用いて Conventional PCR を行なった。これらのプライマー・ペアは、図 1 に示すように、*pks*

island の 5'末端付近の *clbQ* 遺伝子、あるいは 3'末端付近の *clbA* 遺伝子内の配列を検出するよう、Primer3Plus

(<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) で設計し、ユーロフィンジェノミクス株式会社に委託して作製した。

表 2. PCR に用いたプライマー・ペア (2)

プライマー		PCR 産物の サイズ(塩基対)
clbQ-F	GCACGATCGGACAGGTTAAT	308
clbQ-R	TAGTCTCGGAGGGATCATGG	
clbA-F	AAGCCGTATCCTGCTCAAAA	342
clbA-R	GCTTCTTTGAGCGTCCACAT	

*pks* 陽性腸管洗浄液検体での腸内細菌科細菌全体に対する *pks* 陽性細菌の割合

腸管洗浄液から抽出した DNA が Conventional PCR で *pks* 陽性と判定された場合、元の腸管洗浄液に含まれていた腸内細菌科細菌全体に対する *pks* 陽性細菌の割合をおおまかに見積もるため、以下の方法を用いた。

いずれも別個の症例由来で、かつ抽出した DNA が Conventional PCR で *pks* 陽性と

判定された腸管洗浄液 3 種類 (UT179B, UT184B, UT189B) を検討に用いた。それぞれの腸管洗浄液を前述の方法で接種・培養しておいた寒天培地からコロニーを 10 個ずつまとめて採取し、PBS 内で懸濁してから DNA を抽出し、Conventional PCR を施行した。

#### *pks* 陽性細菌は全て *E. coli* であるか？

いずれも別個の症例由来で、かつ Conventional PCR で *pks* 陽性と判定された単一菌株 7 株 (UT060SC、UT063SC、UT081SC、UT126SC、UT158SC、UT186SC) の DNA につき、表 2 に示した他の 3 種類のプライマー・ペア uidA-F,R、EntrbFam-F,R、および 16S-Univ-F,R を用いて Conventional PCR を施行し、これらが *E. coli* に属するか否か、および、腸内細菌科に属するか否かを確認した。

*E. coli* 以外の菌種であることが示唆された場合には、菌種を同定するため、16S rRNA 遺伝子内の配列を DNA シーケンシングすることとした。

16S rRNA 遺伝子 (全長約 1500 塩基対) は全ての細菌ゲノムに存在し、細菌間で高度に保存された領域と、系統発生に伴い細菌間で多様性が見られる領域 (v 領域) が存在する。この性質を利用して、菌株間の類縁関係解析や菌種同定に頻用されている。この中の 799 塩基対の領域を増幅するプライマー・ペアを使用した (表 3)。

表 3. PCR に用いたプライマー・ペア (3)

プライマー		PCR 産物の サイズ(塩基対)	出典
UniID-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	799	Huws, 2007
UniID-R	GGACTACCAGGGTATCTAAT		

UT126SC-DNA をこのプライマー・ペア UniID-F,R と耐熱性 DNA ポリメラーゼ LA Taq with GC Buffer を用いた Conventional PCR で増幅し、PCR 産物の一部を使用してアガロース・ゲル電気泳動で確認後、残りを MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製し、Sanger 法による DNA シークエンシング (ユーロフィンジェノミクス株式会社に委託) に供した。シークエンシング結果を、米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) で照合して菌種を同定した。

## Ⅱ. *pks* 陽性細菌保有率と大腸癌の関連の検討

### 統計学的手法

結果から二群間の比較を行なう場合には、 $\chi^2$  検定あるいは Mann-Whitney の U 検定を用いた。得られた  $p$  値は 0.05 未満を統計学的に有意であるとした。

### Ⅲ. *clbP* 遺伝子の多型の検討

NCBI で公開されている *E. coli* のリファレンスゲノム配列 (*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655) から *clbP* 遺伝子 (1515 塩基対) の配列を入手し、この領域をカバーするように、表 4・図 3 に示す 3 種類のプライマー・ペアを設計・作製した。

表 4. PCR に用いたプライマー・ペア (4)

プライマー		PCR 産物の サイズ(塩基対)
clbP-1-F	GGCCGCAAAGTAATATTGTCC	428
clbP-1-R	CGTTGTTGCTGTGTTTTTGGG	
clbP-2-F	GCGATAAACACGGAAAGCAC	775
clbP-2-R	TCGGCTGGAAAACCCTATG	
clbP-3-F	CCCGTCACATTTTCAATCACC	668
clbP-3-R	CGTGAGCACAGTGAATTTATCTCC	



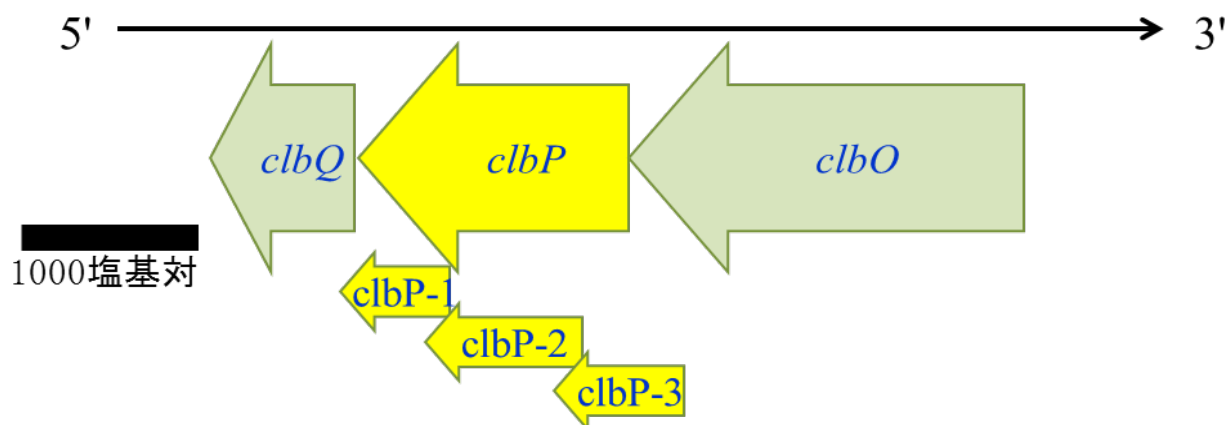


図 3. *clbP* 遺伝子の分割 PCR

[凡例] *clbP-1*: プライマー・ペア *clbP-1-F,R* により増幅される配列、以下同様

前述の方法で腸管洗浄液由来の単一菌株 DNA を入手し、この中から、いずれも別個の症例由来で、かつ Conventional PCR で *pks* 陽性と判定された 7 株の DNA を検討に用いた (UT009-SC-DNA、UT060-SC-DNA、UT063-SC-DNA、UT081-SC-DNA、UT126-SC-DNA、UT158-SC-DNA、UT186-SC-DNA)。それぞれにつき、表 2 に示す 3 種類のプライマー・ペアと耐熱性 DNA ポリメラーゼ LA Taq with GC Buffer を用いた Conventional PCR を行ない、PCR 産物の一部を使用してアガロース・ゲル電気泳動で確認後、残りを MinElute PCR Purification Kit で精製し、Sanger 法による DNA シークエンシングに供した。

## 結果

### I. 腸管洗浄液および便を用いた *pks* 陽性細菌検出法の確立

#### Conventional PCR における *pks* 陽性細菌 DNA の検出閾値の検討

図 4 に示す通り、*pks* 陽性細菌 DNA 量が 1pg 以上であれば Conventional PCR で明確に検出可能であった。( *pks* 陽性細菌 DNA 量が 0.1~1pg でもかろうじて検出できる可能性が示唆された。) *pks* 陽性細菌 DNA が全て *E. coli* に由来すると仮定すると、*E. coli* ゲノム質量がおおよそ  $5 \times 10^{-15}$ g/copy であることから、検出閾値は採取直後の腸管洗浄液検体 1 本 (10mL 程度) あたり *pks* 陽性 *E. coli*  $1 \times 10^5$  個に相当すると考えられる。

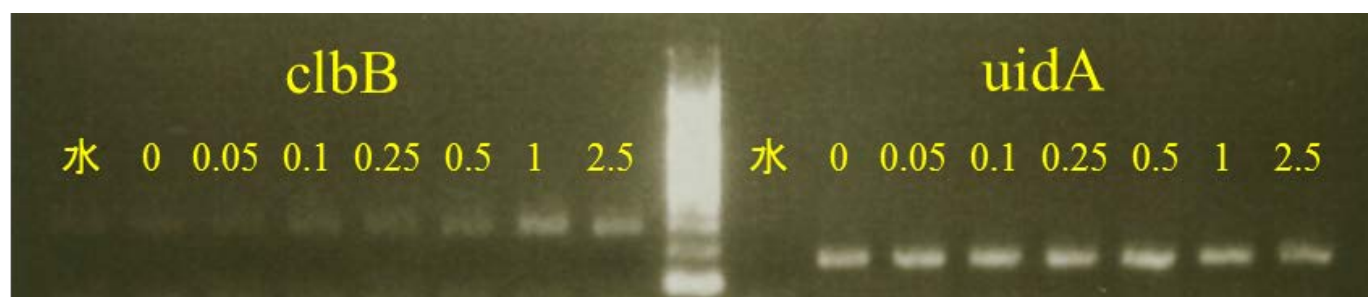


図 4. Conventional PCR による *pks* 陽性細菌 DNA の検出閾値の検討  
[凡例]

水のレーン以外は、いずれも DNA 総量 500pg で PCR を施行した結果  
図中の数字は、そのうち何 pg が UT060SC-DNA であったかを示す

以上の結果は、図 5 に示す通り、qPCR による *pks* 陽性細菌 DNA 量の定量値とも

おおむね良く整合した。

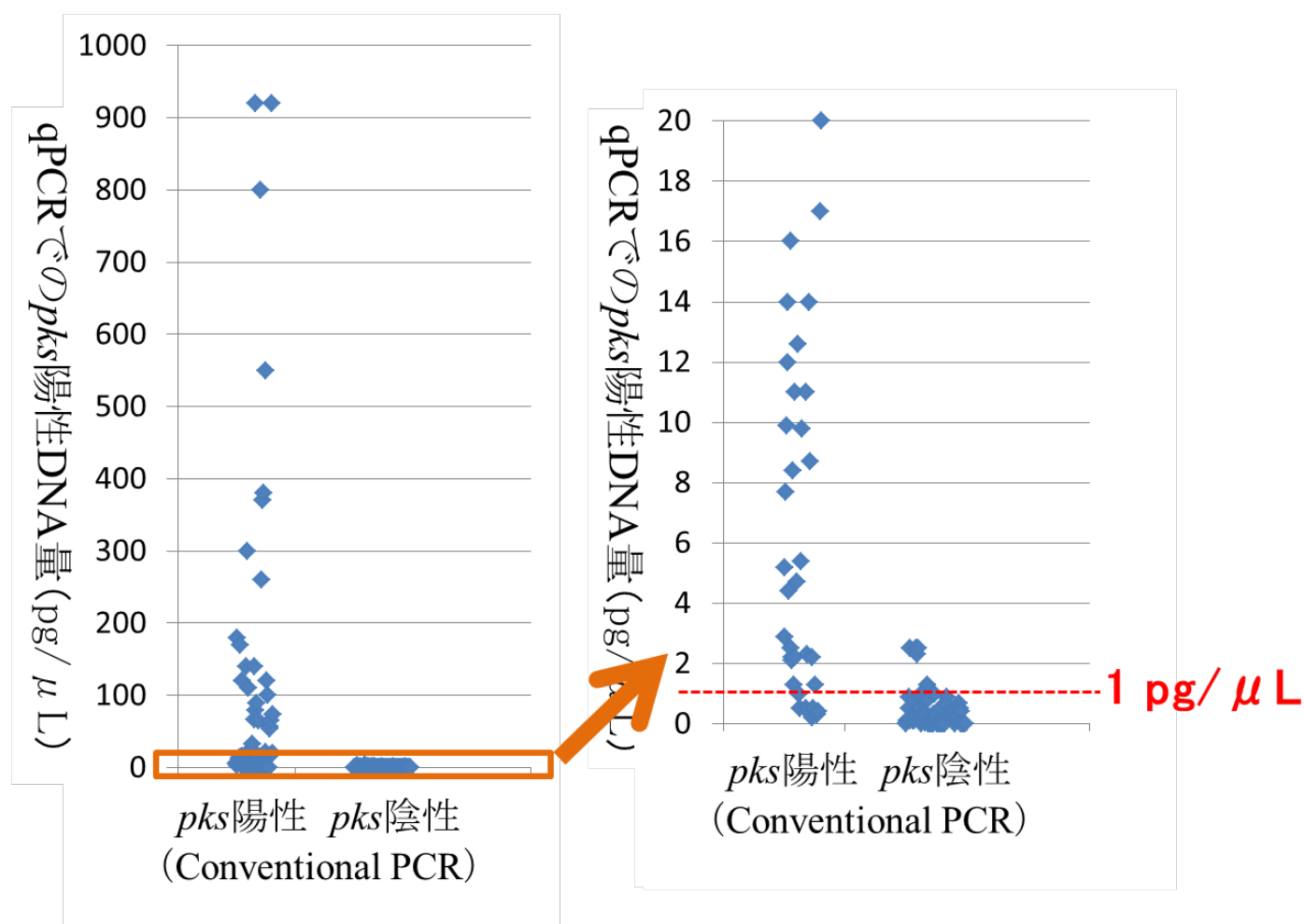


図 5. Conventional PCR での *pks* 陽性/陰性と qPCR での *pks* 陽性細菌 DNA 量の定量値の関係  
左のグラフから、DNA 量 < 20 pg/μL の部分のみ拡大して右のグラフに示した。

#### PCR に使用したプライマーの妥当性判定

図 6 に示す通り、*clbB* 遺伝子を有する 4 株全てが、*clbQ* および *clbA* 遺伝子も有することが確認された。このことより、*pks* island の有無の判定は、*clbB* 遺伝子の有無で良好に代替できると考えられた。

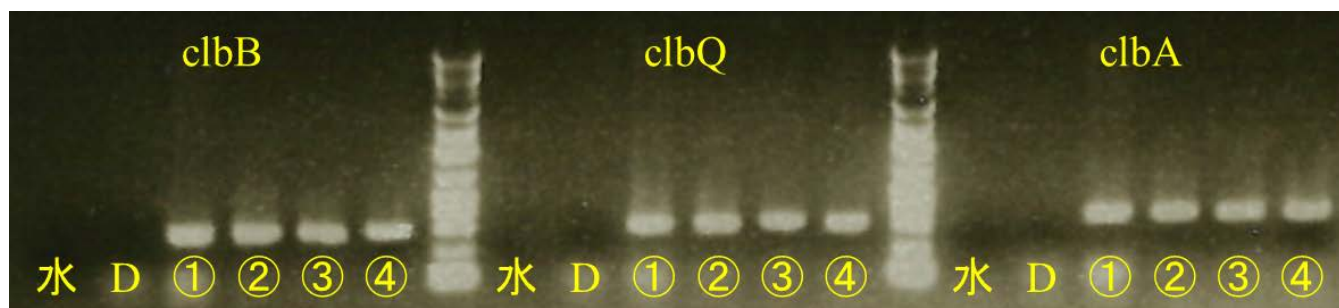


図 6. Conventional PCR による *clbB*・*clbQ*・*clbA* 遺伝子の検出  
 [凡例] D: DH5  $\alpha$ 、①: UT009SC01、②: UT060SC、③: UT063SC、  
 ④: UT081SC

*pks* 陽性腸管洗浄液検体での腸内細菌科細菌全体に対する *pks* 陽性細菌の割合

結果を図 7 に示す。腸管洗浄液 UT179B 由来のコロニー10 個からまとめて抽出した DNA は *pks* 陽性と判定され、別のコロニー10 個で再試験しても同じ結果であった。一方、腸管洗浄液 UT184B あるいは UT189B 由来のコロニー10 個からまとめて抽出した DNA は *pks* 陰性と判定された。従って、腸管洗浄液 UT179B に含まれていた腸内細菌科細菌全体に対する *pks* 陽性細菌の割合はおおむね 1/10 あるいはそれ以上、腸管洗浄液 UT184B および UT189B に含まれていた腸内細菌科細菌全体に対する *pks* 陽性細菌の割合は 1/10 を下回る可能性が高いと推定した。

一方、上記各々の腸管洗浄液から抽出した DNA を qPCR で解析した結果を表 5 に示す。腸内細菌科細菌全体に対する *pks* 陽性細菌の割合をある程度近似すると思われる *pks* 陽性細菌 DNA / *E. coli* DNA 比は、上述の推定と大きな解離はなかった。

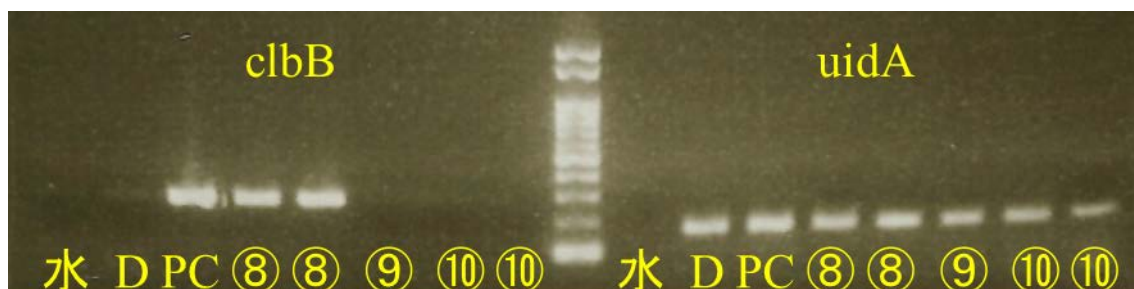


図 7. コロニー10 個からまとめて抽出した DNA の Conventional PCR 結果  
[凡例] D: DH5  $\alpha$  DNA

PC: *pks* 陽性コントロール DNA (UT060SC-DNA)、

⑧: UT179B 由来のコロニー10 個からまとめて抽出した DNA  
(コロニー10 個ずつを独立して2 回採取)

⑨: UT184B 由来のコロニー10 個からまとめて抽出した DNA

⑩: UT189B 由来のコロニー10 個からまとめて抽出した DNA  
(コロニー10 個ずつを独立して2 回採取)

表 5. 図 7 で使用した腸管洗浄液から抽出した DNA の qPCR 結果

	UT179B	UT184B	UT189B
<i>pks</i> 陽性細菌 DNA (pg/ $\mu$ L)	73	1.3	1.2
<i>E. coli</i> DNA (pg/ $\mu$ L)	78	12	340
全細菌 DNA (pg/ $\mu$ L)	3300	13000	800

*pks* 陽性細菌は全て *E. coli* であるか？

図 8 に示す通り、7 株全てが腸内細菌科細菌であった。そのうち 6 株が *E. coli* で、1 株 (UT126SC) は *E. coli* 以外の腸内細菌科細菌と考えられた。

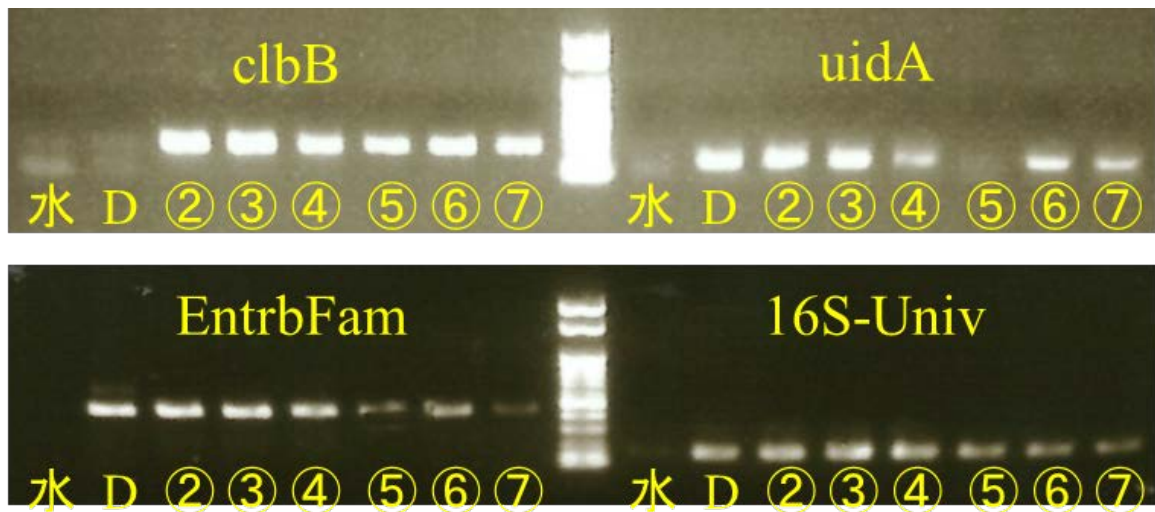


図 8. *pks* 陽性単一菌株 DNA の Conventional PCR 結果 : *E. coli* であるか否かの判定  
 [凡例] D: DH5 $\alpha$ 、②: UT060SC、③: UT063SC、④: UT081SC  
 ⑤: UT126SC、⑥: UT158SC、⑦: UT186SC

UT126SC の菌種を同定するため、16S rRNA 遺伝子内の配列を DNA シークエンシングし、NCBI BLAST で照合した結果、腸内細菌科細菌の一種である *Klebsiella pneumoniae* のリファレンスゲノム配列 (*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286 chromosome, complete genome; Sequence ID: ref|NC\_016845.1|) と 8 箇所 of 配列で 99.4% 以上と、登録されているリファレンスゲノム配列の中で最も一致度が高かった (図 9)。これより、UT126SC は *Klebsiella pneumoniae* であると推定した。

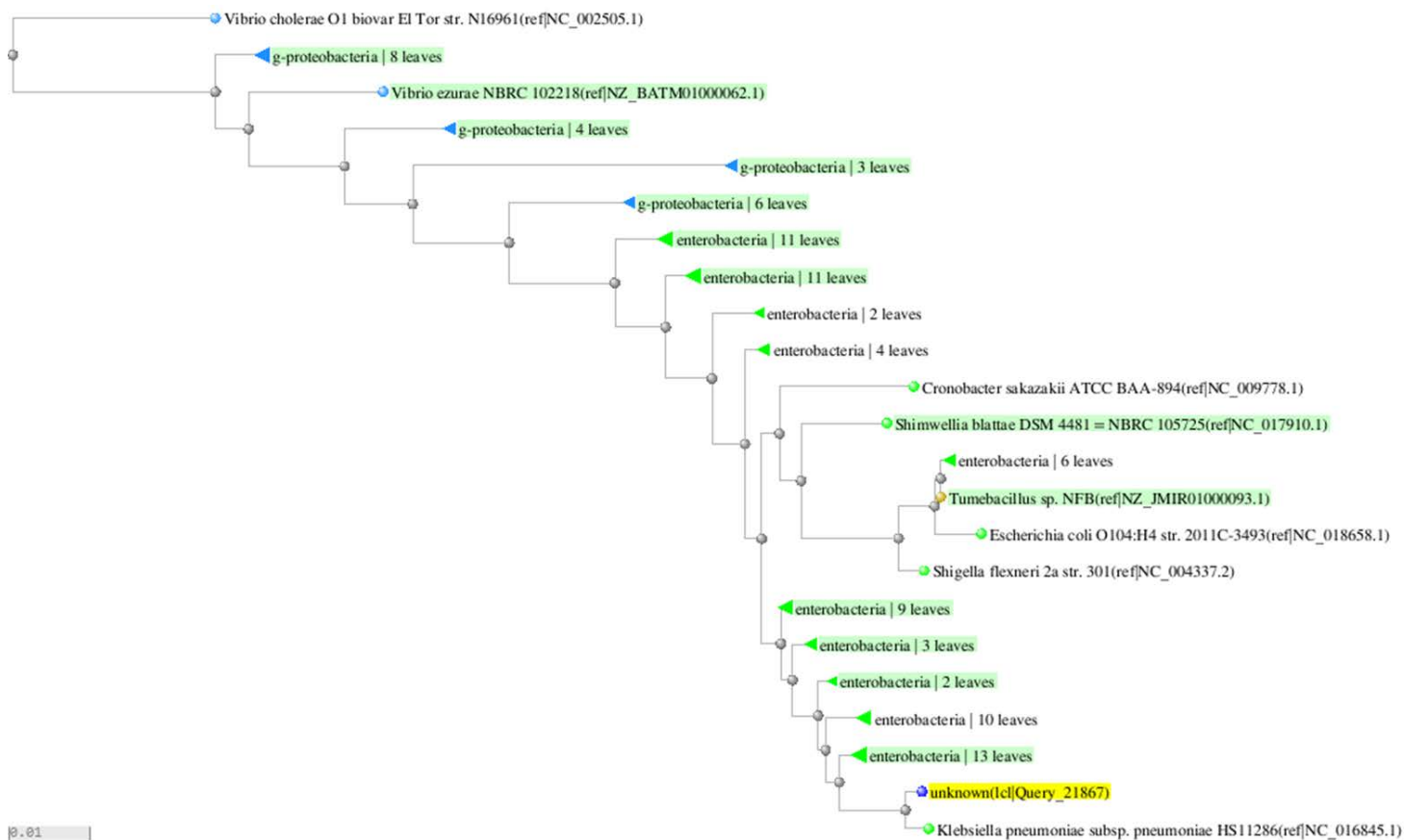


図 9. UT126SC の NCBI BLAST 照合結果  
 図中、黄色表示されているのが UT126SC

## Ⅱ. *pks* 陽性細菌保有率と大腸癌の関連の検討

### 腸管洗浄液 解析対象症例

2014 年 1 月から腸管洗浄液採取を開始し、2015 年 6 月までに 172 人の症例から腸管洗浄液を採取した。

症例の内訳を表 6 に示す。年齢は 27～97 歳(平均 65.4 歳)、性別は男性 115 人(66.9%);女性 57 人(33.1%)、疾患は大腸癌 57 人(33.1%);腺腫 63 人(36.6%);炎症性腸疾患 7 人(4.1%);Control 45 人(26.2%)であった。なお疾患のカテゴリ分けについては、既往のみの場合も含め大腸癌の症例は全て大腸癌カテゴリに含め、それ以外のうち、既往のみの場合も含め腺腫の症例は全て腺腫カテゴリに含め、残りを炎症性腸疾患カテゴリと Control カテゴリに分けた。大腸疾患以外の疾患の有無や、食習慣、抗菌薬使用歴等は、カテゴリ分類に際して考慮しないものとした。



表 6. 腸管洗浄液 解析対象症例

			人数(人)
年齢	49 歳以下		25
	50～59 歳		25
	60～69 歳		48
	70～79 歳		51
	80 歳以上		23
性別	男性		115
	女性		57
疾患	大腸癌	未治療かつ閉塞なし	18
		治療中・治療後・閉塞例	39
		(小計)	(57)
	腺腫	現在腺腫あり	46
		既往のみ	17
		(小計)	(63)
	炎症性腸疾患		7
	Control		45
総計		172	

腸管洗浄液を前述の方法で処理し、培地上のコロニー目視計測で腸内細菌科細菌数を算出した。採取した腸管洗浄液全量(10mL 程度)あたりの腸内細菌科細菌数の分布を図 10 に示す。

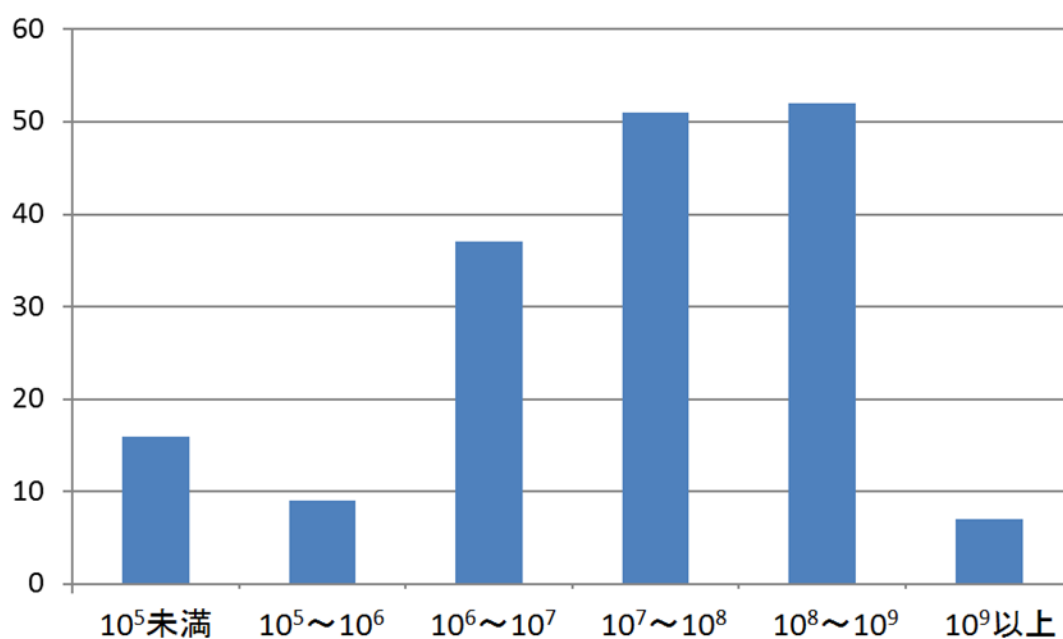


図 10. 腸管洗浄液全量あたりの腸内細菌科細菌数(培養法)

[凡例] 横軸: 腸管洗浄液全量あたりの腸内細菌科細菌数(CFU)

縦軸: 症例人数(人)

## 腸管洗浄液 疾患カテゴリ別の *pks* 陽性細菌保有率

### 【1】

疾患カテゴリ別の *pks* 陽性細菌保有率は表 7 に示す通り、大腸癌で 37%、腺腫で 44%、炎症性腸疾患で 29%で、いずれも Control (42%) との間に有意差は示されなかった。

表 7. 腸管洗浄液 疾患カテゴリ別の *pks* 陽性細菌保有率 (1)

	<i>pks</i> 陽性	<i>pks</i> 陰性	計	<i>pks</i> 保有率	
大腸癌	22	35	57	37%	$p=0.711$
腺腫	28	35	63	44%	$p=0.818$
炎症性腸疾患	2	5	7	29%	$p=0.494$
Control	19	26	45	42%	
計	71	101	172	41%	

### 【2】

得られた腸管洗浄液が高度に希釈されていた場合、腸管洗浄液検体に含まれる全細菌数が極端に少なくなる。このような検体では、仮に *pks* 陽性細菌が存在してもその DNA の絶対濃度が Conventional PCR の検出閾値を下回る可能性が高くなる。

Conventional PCR における *pks* 陽性細菌 DNA の検出閾値が前述の通り 1pg/ $\mu$  L であること、大腸内の全細菌に対する *E. coli* の存在比が一般に 0.1%程度とさ

れていることを参考とし、プライマー・ペア 16S-Univ-F,R を用いた qPCR で定量された全細菌 DNA 量が 500pg/ $\mu$  L を下回る腸管洗浄液検体を除外して再解析を行った。

再解析対象は 104 人となった。その内訳を表 8 に示す。大腸癌と炎症性腸疾患で、男性が Control に比して有意に多かった。

表 8. 腸管洗浄液 絞り込み再解析(1) 解析対象症例

疾患	人数(人)	年齢 (平均;歳)	<i>p</i> 値	性別 (男性;%)	<i>p</i> 値	腸管洗浄液あたり 腸内細菌科細菌数 (中央値: 10 <sup>7</sup> CFU)	<i>p</i> 値
大腸癌	35	68.2	0.223	74.3	0.025	3.0	0.640
腺腫	37	68.5	0.191	64.9	0.140	10	0.216
炎症性腸疾患	6	49.2	0.059	100	0.017	7.0	0.961
Control	26	62.8		46.2		6.8	
総計	104	65.9		65.4		7.5	

症例を絞り込んだ上での疾患カテゴリ別の *pks* 陽性細菌保有率を表 9 に示す。

大腸癌で 43%、腺腫で 51%、炎症性腸疾患で 17%で、いずれも Control(46%)との間に有意差は示されなかった。

表 9. 腸管洗浄液 疾患カテゴリ別の *pks* 陽性細菌保有率 (2)

	<i>pks</i> 陽性	<i>pks</i> 陰性	計	<i>pks</i> 保有率	
大腸癌	15	20	35	43%	$p=0.798$
腺腫	19	18	37	51%	$p=0.685$
炎症性腸疾患	1	5	6	17%	$p=0.185$
Control	12	14	26	46%	
計	47	57	104	45%	

### 【3】

大腸癌の場合、内視鏡的/外科的切除後・化学療法中など治療既往のある症例では、病変の変化や抗菌薬使用の影響により腸内細菌叢が影響を受けている可能性が高く、未治療症例と区別する必要があると考えられた。また未治療症例の中でも、原発巣や腹膜播種により大腸閉塞を来たしている場合には腸内細菌叢に変化が起きていることが予想され、またこれらは前述のように内視鏡検査の前処置も通常と異なるため、閉塞例および閉塞解除後例を別個に扱うこととした。また腺腫の場合、過去に腺腫が切除されており現在は腺腫がない症例では、現在腺腫がある症例と腸内細菌叢に違いがある可能性が考えられ、別個に扱うこととした。

その内訳を表 10 に示す。新たに設けた「大腸癌(未治療かつ閉塞なし)」カテゴリと「腺腫(現在腺腫あり)」で、年齢・性別・腸管洗浄液内の腸内細菌科細菌数に Control との有差はなかった。

表 10. 腸管洗浄液 絞り込み再解析(2) 解析対象症例

疾患	人数(人)	年齢 (平均;歳)	<i>p</i> 値	性別 (男性;%)	<i>p</i> 値	腸管洗浄液あたり 腸内細菌科細菌数 (中央値:10 <sup>7</sup> CFU)	<i>p</i> 値
大腸癌 (未治療かつ閉塞なし)	12	69.1	0.285	75.0	0.096	8.5	0.063
大腸癌(全体)	35	68.2	0.223	74.3	0.025	3.0	0.640
腺腫 (現在腺腫あり)	24	68.5	0.228	62.5	0.247	8.3	0.586
腺腫(全体)	37	68.5	0.191	64.9	0.140	10	0.216
炎症性腸疾患	6	49.2	0.059	100	0.017	7.0	0.961
Control	26	62.8		46.2		6.8	
総計	104	65.9		65.4		7.5	

症例を再度絞り込んだ上での疾患カテゴリ別の *pks* 陽性細菌保有率を表 11 に示す。大腸癌(未治療かつ閉塞なし)で 58%、腺腫(現在腺腫あり)で 50%、炎症性腸疾患で 17%で、いずれも Control (46%)との間に有意差は示されなかった。

表 11. 腸管洗浄液 疾患カテゴリ別の *pks* 陽性細菌保有率 (3)

	<i>pks</i> 陽性	<i>pks</i> 陰性	計	<i>pks</i> 保有率	
大腸癌(未治療かつ閉塞なし)	7	5	12	58%	<i>p</i> =0.485
大腸癌(全体)	15	20	35	43%	<i>p</i> =0.798
腺腫(現在腺腫あり)	12	12	24	50%	<i>p</i> =0.786
腺腫(全体)	19	18	37	51%	<i>p</i> =0.685
炎症性腸疾患	1	5	6	17%	<i>p</i> =0.185
Control	12	14	26	46%	
計	47	57	104	45%	

【4】

上項【3】で Conventional PCR にて *pks* 陽性と判定された症例につき、qPCR での *pks* 陽性細菌 DNA 量(全細菌 DNA との比)を疾患カテゴリ別に比較した。結果を図 11 に示す。大腸癌(未治療かつ閉塞なし)・腺腫(現在腺腫あり)・炎症性腸疾患、いずれも Control との間に有意差は示されなかった。

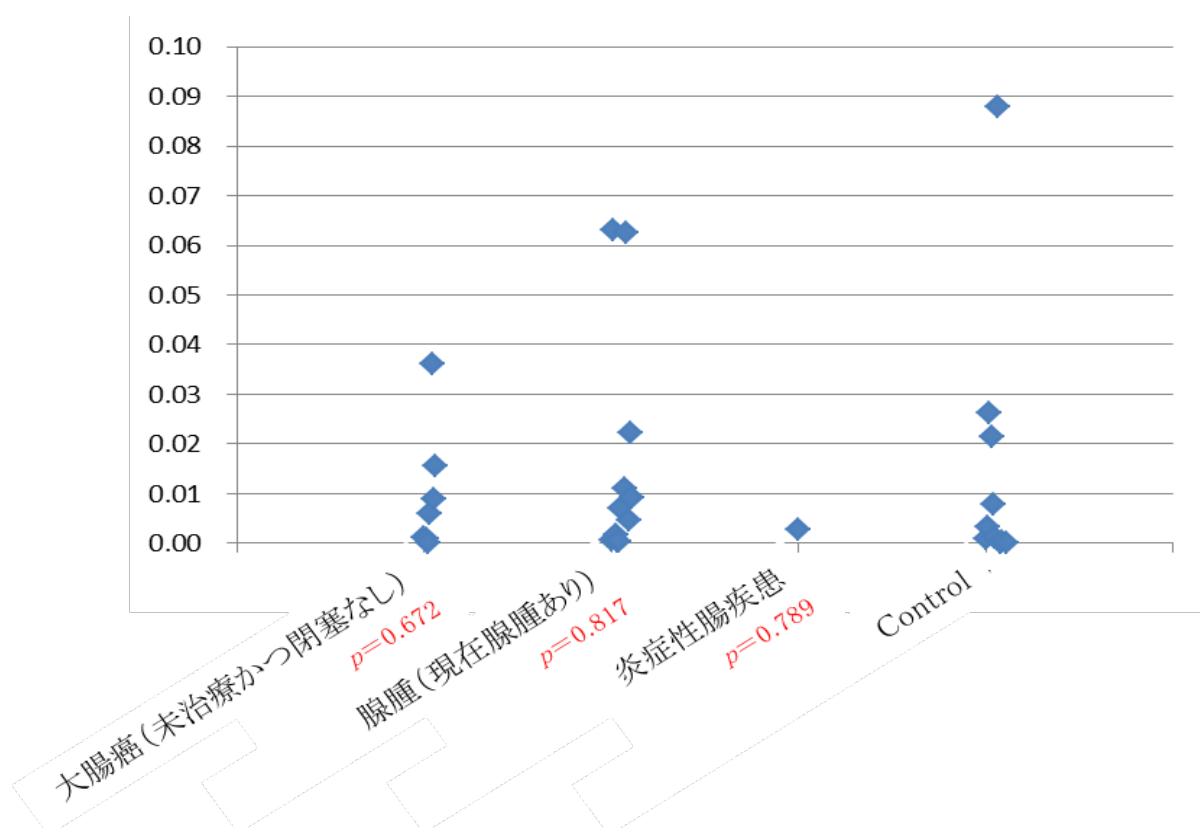


図 11. *pks* 陽性例の *pks* 陽性細菌 DNA 量(全細菌 DNA との比)の疾患カテゴリ別比較

表 9 に示した 104 人について、年齢や性別と *pks* 陽性細菌 DNA 量(全細菌 DNA との比)の関連も検討したが、図 12 に示す通り、いずれも関連は否定的であった(年齢については  $R^2=0.061$  ; 性別については  $p=0.104$ )。

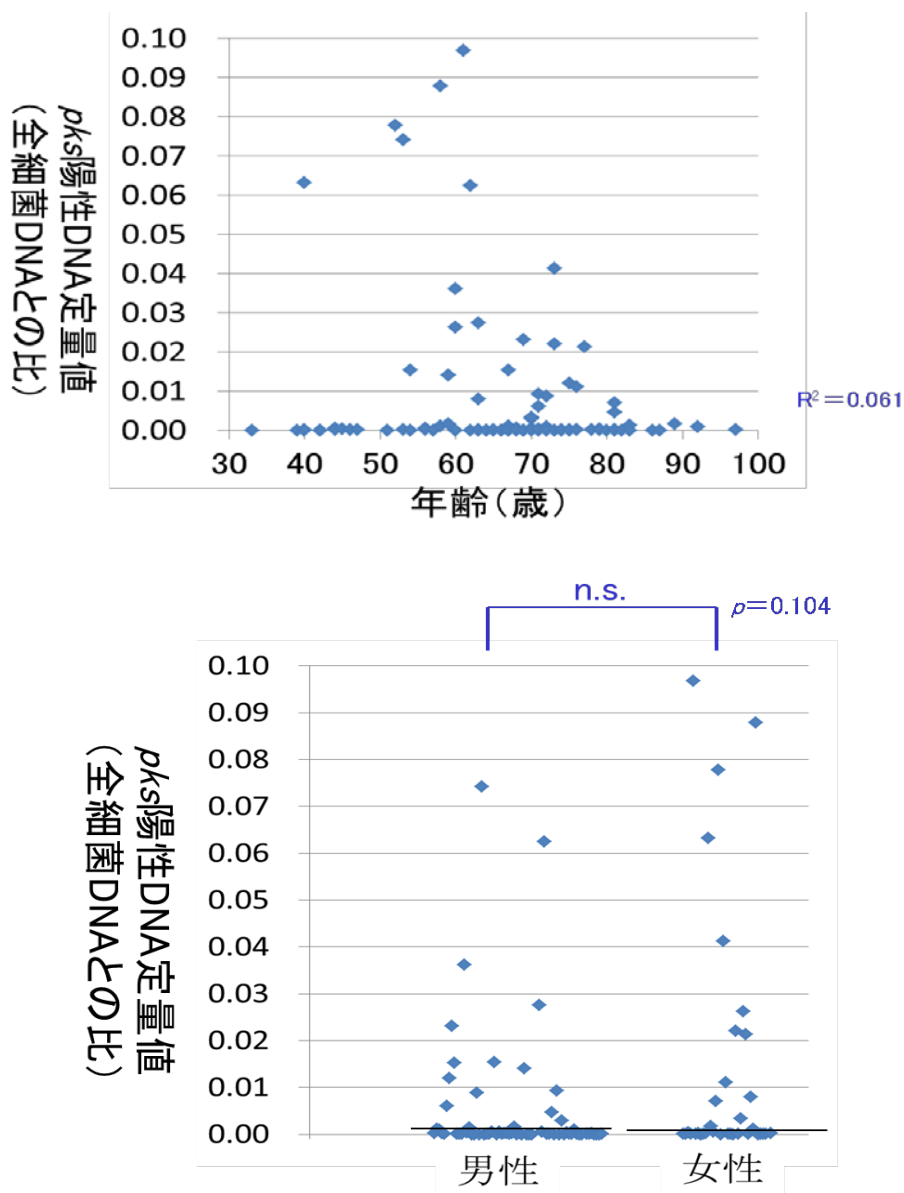


図 12. 年齢・性別と *pks* 陽性細菌 DNA 量(全細菌 DNA との比)  
 上図: 年齢(歳:横軸)と *pks* 陽性細菌 DNA 量(全細菌 DNA との比:縦軸)  
 下図: 性別(横軸)と *pks* 陽性細菌 DNA 量(全細菌 DNA との比:縦軸)



腸管洗浄液 *pks* 陽性および陰性 それぞれの症例の特徴

表 9 に示した 104 人について、*pks* 陽性および陰性の症例それぞれにつき、検討した臨床的因子をまとめたものを、表 12 に示す。

いずれも有意差を認めなかった。

表 12. *pks* 陽性および陰性 それぞれの症例の特徴

	<i>pks</i> 陽性 n=47	<i>pks</i> 陰性 n=57	<i>p</i>
年齢(平均:歳)	65.0	66.6	0.261
性別(男性:%)	61.7	68.4	0.473
腸管洗浄液あたり腸内細菌科細菌数 (中央値:10 <sup>7</sup> CFU)	10.0	6.75	0.155
大腸癌(%)	31.9	35.1	0.798 (*)
腺腫(%)	40.4	31.6	0.685 (*)
IBD(%)	2.1	8.8	0.185 (*)
Control(%)	25.5	24.6	—

(\*) Control 症例との比較

## 便検体での検討

腸管洗浄液を採取した 3 人の症例 (UT152、UT189、UT191) から、後日、便を採取した。各症例の腸管洗浄液採取から便採取までの間隔、便採取前 2 週間以内の食餌・抗菌薬使用歴を表 13 に示す。

表 13. 便 解析対象症例

症例	年齢	性別	疾患カテゴリ	腸管洗浄液採取～ 便採取の間隔	食餌歴	抗菌薬 使用歴	備考
UT152	65 歳	男性	Control	56 日	53 日目に 禁食	53 日目に ABPC/SBT	—
UT189	72 歳	女性	大腸癌 (未治療・狭窄なし)	17 日	16 日目に 禁食	なし	16 日目に 内視鏡
UT191	73 歳	女性	大腸癌 (未治療・狭窄なし)	11 日	なし	なし	—

各症例ごとに、腸管洗浄液から抽出した DNA と、便から抽出した DNA の

Conventional PCR、qPCR の結果を表 14 に示す。

表 14. 腸管洗浄液と便の PCR 結果の比較

症例 検体種別	UT152		UT189		UT191	
	腸管洗浄液	便	腸管洗浄液	便	腸管洗浄液	便
<i>pks</i> (Conventional PCR)	—	—	+(微弱)	—	—	+
<i>pks</i> 陽性細菌 DNA (pg/μL)	0.3	0.4	1.2	0.1	0.8	550
<i>E. coli</i> DNA (pg/μL)	0.7	68	340	390	0.5	940
全細菌 DNA (pg/μL)	460	9700	800	13000	160	20000

### Ⅲ. *clbP* 遺伝子の多型の検討

表 4 に示す 3 種類のプライマー・ペアを用いた Conventional PCR の結果、いずれのプライマー・ペアでも 7 株全てで想定通りのサイズの DNA が増幅された(図 13)。

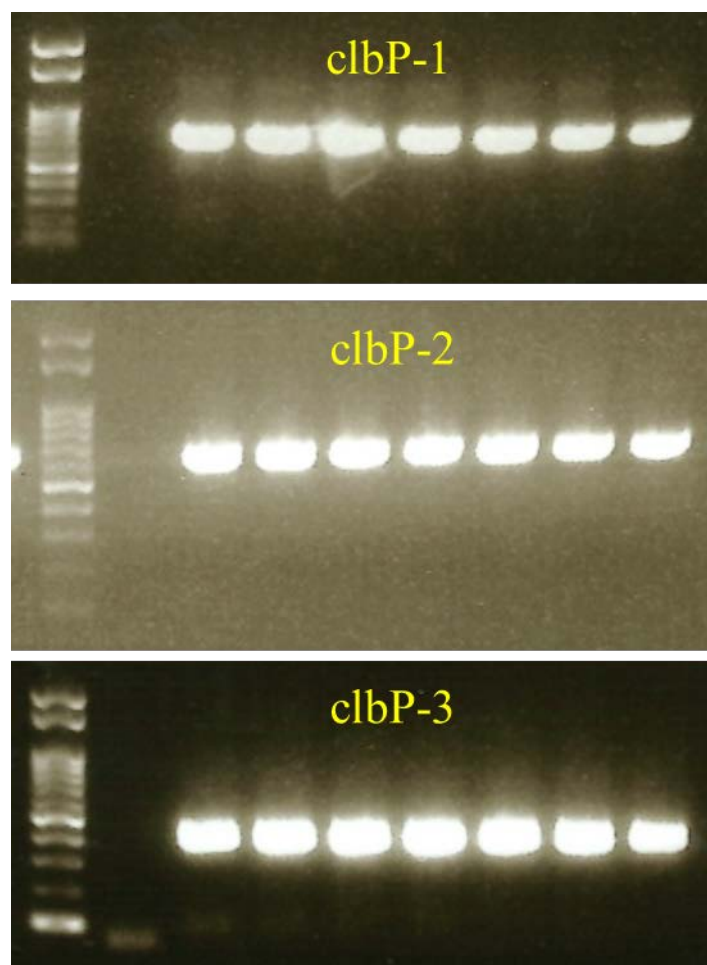


図 13. *clbP* 遺伝子の分割 PCR 結果

[凡例] 左から、DH5  $\alpha$ 、UT009SC、UT060SC、UT063SC、  
UT081SC、UT126SC、UT158SC、UT186SC

それぞれの PCR 産物をシーケンシングすることで、*clbP* 遺伝子(1515 塩基対)の全長のシーケンシングに成功した。結果を *E. coli* のリファレンスゲノム配列

(*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655)と比較したところ、UT009SC、UT060SC、UT063SC、UT126SC、UT158SC、UT186SC は完全一致であった。UT081SC は 362 番目の塩基が G (グアニン) でなく A (アデニン) であり、これにより翻訳後蛋白の 385 番目のアミノ酸がアラニンでなくバリンとなっている (図 14・図 15)。

	(塩基対)
TTACTCATCGTCCCACTCCTTGTTGTGTAATAGAATTCGTTTAATTTGAT	50
GATTTAATGTCAGAACGAAAGCTAACAGGATAATTCCGAACGGTATCGCC	100
AACACGCTCGATGGACCCCATACCAAGATAAAACGCCAGTCAAGTCCTGG	150
AGATAGTATACCCGGTGCACATAGAGCATGGCGGCCACGAGCCAGGAA	200
CCGCCAAGGCGATGATATAGTCACGTACGCGTAAACGTAACCTCTGCTGT	250
TTTCCAGGGCCATGCGCCGTTGCGCGATAAACACGGAAAGCACCGCGCAC	
TACAACCACCGCCCCCAAAAACACAGCAACAACGTGAGGTAGACGAAAA	
GGGTATCGGTGGTGTAAATTGCATCACCAGCGCCGTCAGCATATTTGCCA	
ATGCGCAGATAAATTATCGATATCCGCGCAAAGCTGTAGTATCAGATTGCA	
ATTCATAATTTGCCAGCGCAACAATGCCAATCTGCTGATCCGGTCGCAACG	500
CAATGCAAGAAGAAAAGTTTGGATTCTGCCACCGTGACTGATGTAAGGG	
CCTTGATTCTGGTCGATAAACCAACCGCTGGCATAGAGGATACGATTGTC	
TGCGGCAAGCGGAACATCACTATTACCACGCCAACTGTTACTCATCGCCT	
CACGCAGCGTTGCCGGCAAAGCCTTTCTGTGCAACCAGGCGTCTATCCAT	
ATTTCCATATCAGGCAGAGTGCTATGGATATAGGCGGCAGGAACATGGTT	750
CCGGGCCAGAGGCGCATGAAACAGAACGGGTTTGCCGAATCCCAGTTTAT	
AGCCGCTTGCCCTTGTTGACAATAATCTCATCCCCCTTAAGTCCACAGTC	
GCCGACATGCCAGCGGCTGCGTGAGTCGTTCCGCAATGACCTCTGTAAA	
GGTTTTTCCCGTCACATTTTCAATCACCGCGCCCAACACATCATAATTGG	
CGGAGGCATAGCTAAACTTCGCACCCGGCGCAAACAGCAGATTCTCGTTG	1000
CGCAGTTGCTGTGCCACAGCGCTCCCAGGCATAGGGTTTTCCAGCCGAGC	
CAGTGTGAAAAAGGCAATCCTGATGTATGATAAAGGAAATCAGCCACGG	
TCAGGGAAGCAGTTTTCCCTGATAATTCAAGCGCATTTCCGGCAGATAG	
GTAATGATATCATCCCCTTGCCGGAGTCTGCCTTCCTGAATCAGTATTTG	
CACCACAAGTCCGGTAAACGCCTTACTCATCGATCCCAGCTCGTAAACTG	1250
TTGTCTAGAGTATTCGCTTTCTGACTAGCCACATCGGCAACACCGTAGACA	
AATCGCTGACGTACCCCTTAATGGTCACACTTACGGAAGGGCTGGGAC	
CTTGGCCTCCTGCATCCGTTGGTGAATTAATGTGACAGGCGCTCATCTT	
GCGCCCCGATAGGCTCATGTTCTTGCGCCAAAGCGCACATAGCGGAAATA	
AAGAGCAGCATACAGCACAGGAGATGATATAATGTTTTAATGCTAACGTG	1500
TTCCATTATTGTCAT	

図 14. *clbP* 遺伝子の塩基配列 (リファレンス配列)  
赤丸が今回認められた変異 (本文参照)

1 MetThrIleMetGluHisValSerIleLysThrLeuTyrHisLeuLeuCysCysMetLeu 20  
 21 LeuPheIleSerAlaMetCysAlaLeuAlaGlnGluHisGluProIleGlyAlaGlnAsp 40  
 41 GluArgLeuSerThrLeuIleHisGlnArgMetGlnGluAlaLysValProAlaLeuSer 60  
 61 ValSerValThrIleLysGlyValArgGlnArgPheValTyrGlyValAlaAspValAla 80  
 81 SerGlnLysAlaAsnThrLeuAspThrValTyrGluLeuGlySerMetSerLysAlaPhe 100  
 101 ThrGlyLeuValValGlnIleLeuIleGlnGluGlyArgLeuArgGlnGlyAspAspIle 120  
 121 IleThrTyrLeuProGluMetArgLeuAsnTyrGlnGlyLysProAlaSerLeuThrVal 140  
 141 AlaAspPheLeuTyrHisThrSerGlyLeuProPheSerThrLeuAlaArgLeuGluAsn 160  
 161 ProMetProGlySerAlaValAlaGlnGlnLeuArgAsnGluAsnLeuLeuPheAlaPro 180  
 181 GlyAlaLysPheSerTyrAlaSerAlaAsnTyrAspValLeuGlyAlaValIleGluAsn 200  
 201 ValThrGlyLysThrPheThrGluValIleAlaGluArgLeuThrGlnProLeuGlyMet 220  
 221 SerAlaThrValAlaValLysGlyAspGluIleIleValAsnLysAlaSerGlyTyrLys 240  
 241 LeuGlyPheGlyLysProValLeuPheHisAlaProLeuAlaArgAsnHisValProAla 260  
 261 AlaTyrIleHisSerThrLeuProAspMetGluIleTrpIleAspAlaTrpLeuHisArg 280  
 281 LysAlaLeuProAlaThrLeuArgGluAlaMetSerAsnSerTrpArgGlyAsnSerAsp 300  
 301 ValProLeuAlaAlaAspAsnArgIleLeuTyrAlaSerGlyTrpPheIleAspGlnAsn 320  
 321 GlnGlyProTyrIleSerHisGlyGlyGlnAsnProAsnPheSerSerCysIleAlaLeu 340  
 341 ArgProAspGlnGlnIleGlyIleValAlaLeuAlaAsnMetAsnSerAsnLeuIleLeu 360  
 361 GlnLeuCysAlaAspIleAspAsnTyrLeuArgIleGlyLysTyrAlaAspGlyAlaGly 380  
 381 AspAlaIleThrAlaThrAspThrLeuPheValTyrLeuThrLeuLeuLeuCysPheTrp 400  
 401 GlyAlaValValValValArgGlyAlaPheArgValTyrArgAlaThrAlaHisGlyPro 420  
 421 GlyLysGlnGlnArgLeuArgLeuArgValArgAspTyrIleIleAlaLeuAlaValPro 440  
 441 GlyLeuValAlaAlaMetLeuTyrValAlaProGlyIleLeuSerProGlyLeuAspTrp 460  
 461 ArgPheIleLeuValTrpGlyProSerSerValLeuAlaIleProPheGlyIleIleLeu 480  
 481 LeuAlaPheValLeuThrLeuAsnHisGlnIleLysArgIleLeuLeuHisAsnLysGlu 500  
 501 TrpAspAspGluEnd 505

図 15. *clbP* 遺伝子の翻訳後蛋白のアミノ酸配列(リファレンス配列より)  
 赤丸が今回認められた変異(本文参照)

## 考察

### I. 腸管洗浄液および便を用いた *pks* 陽性細菌検出法の確立

既報では *pks* 陽性細菌 DNA の検出閾値には具体的に言及していないものが多い。ある既報では 2800copies/ $\mu$  L (*E. coli* DNA で 14pg/ $\mu$  L に相当)と言及が見られるが<sup>29</sup>、本研究での 1pg/ $\mu$  L とは解離した結果である。ただし同既報で PCR に使用された耐熱性 DNA ポリメラーゼは明示されておらず、プライマー・ペアも *clbN* 遺伝子内の配列を検出するもので本研究で使用したものとは異なるため、一概に比較はできない。また、本研究では *pks* 陽性 *E. coli* 単一菌株 DNA と *pks* 陰性 *E. coli* 単一菌株 DNA を混合する方法を用いたが、実際の腸管洗浄液中には他の細菌も多く含まれることを考慮し、腸管洗浄液から抽出された全細菌 DNA を含む検体で *pks* 陰性であったものを、*pks* 陽性 *E. coli* 単一菌株 DNA と混合する方法がより適切であったかもしれない。腸管洗浄液がしばしばそうであるように、特に検体中の全細菌 DNA の絶対量が少ない場合には、Conventional PCR 結果を解釈するに際して、*pks* 陽性細菌 DNA の PCR での検出閾値を考慮する必要があるものと考ええる。

また、腸内細菌科細菌全体に対する *pks* 陽性細菌の割合を培養法と qPCR 法の 2 つの方法で算出し、両者に大きな解離がないことを確認した。qPCR でプライマー・ペア EntrbFam-F,R を用いた検討が未施行であったため、*pks* 陽性細菌 DNA / 全腸内細菌科細菌 DNA 比の代わりに *pks* 陽性細菌 DNA / *E. coli* DNA 比を用いたが、誤差数

倍以内のごく大まかな概算には支障なかったものとする。

*pks* 陽性単一菌株の大部分が *E. coli*、1 株のみ *Klebsiella pneumoniae* という結果は、序文に提示した既報の知見から特に外れたものではなかった。



## Ⅱ. *pks* 陽性細菌保有率と大腸癌の関連の検討

### 大腸疾患と腸管洗浄液中の *pks* 陽性細菌 DNA の有無の関連

腸管洗浄液検体の解析では、大腸疾患と *pks* 陽性細菌保有率の間に有意な関連は認められなかった。前述した既報と比較すると(表 15)、癌症例での *pks* 陽性細菌保有率はおおむね一致しているのに対し、本研究の Control 症例の腸管洗浄液で検討した *pks* 陽性細菌保有率が既報の Control 症例の大腸組織検体と比較して著しく高く、本研究で有意差が出なかった原因と推定される。

表 15. ヒトにおける疾患別の *pks* 陽性細菌保有率を検討した既報

論文	検体種別	症例数[検体数]	症例場所	疾患別の <i>pks</i> 陽性細菌保有率
Arthur, 2012 <sup>28</sup>	組織	45 人[45 検体]	イギリス	癌:67% Control(*):21% ( $p<0.001$ )
Buc, 2013 <sup>27</sup>	組織	69 人[69 検体]	フランス	癌:55% 憩室症:19% ( $p=0.0024$ )
本研究	腸管洗浄液	104 人[104 検体]	日本	癌:58% Control:46% ( $p=0.485$ )

(\*) 癌および炎症性腸疾患を除く全症例であり過半数は過敏性腸症候群

そのような *pks* 陽性細菌保有率の差を生む要因として、以下が考えられる。

要因① 解析対象症例の年齢・性別・疾患構成の違い

要因② 欧米人と日本人の違い(遺伝的あるいは生活習慣の違い)

要因③ 大腸組織検体と腸管洗浄液検体の違い



要因①： Arthur, 2012<sup>28</sup> で検討された大腸癌 21 症例と Control 24 症例については年齢・性別が明らかにされていない。Control 24 症例のうち、13 症例が過敏性腸症候群、4 症例が家族性でない大腸ポリープ、3 症例が痔核、2 症例が大腸憩室症、1 症例が肛門掻痒症、1 症例が健常であった。また、Buc, 2013<sup>27</sup> で検討された大腸癌 38 症例と大腸憩室症 31 症例については、年齢は大腸癌が 35～95 歳(中央値 71 歳； 平均値 67 歳)に対し大腸憩室症が 34～81 歳(中央値 58 歳； 平均値 60 歳)、性別は大腸癌が男性 53%に対し大腸憩室症が男性 42%と、本研究と比較して大きな差異はない。Control 症例は全員、過去に憩室炎反復・膿瘍形成・穿孔等の既往があり待機的手術を必要とした症例で、手術(組織検体採取)時点では炎症・狭窄がないことを確認されている。なおいずれの研究も、腸管外の疾患の有無については記載がなく不明である。

また本研究では腸管洗浄液を採取した症例について、普段の食事内容や、抗菌薬・整腸剤等の投与歴を確認していなかった。これは対象症例の多くが外来症例であり、内視鏡検査の場で薬剤投与歴を詳細に聴取することが時間的に困難であったためであるが、これらの要因により腸管洗浄液中の細菌構成が影響を受けた可能性は否定できない。

要因②： *pks* 陽性細菌保有率を人種や地域で比較した既報はなかった。一方、ヒ

ト腸管内 *E. coli* のうち phylogenetic group B2 株が占める割合を検討した既報を検索したところ、1980～1990 年にフランス(パリ)の健常人 56 人から採取した便中 *E. coli* を検討した報告で B2 株が 11%<sup>15</sup>、1999～2001 年のフランス(本土)の健常人 122 人からの同様の報告で B2 株が 30%<sup>30</sup>、同じく 1999～2001 年頃に日本(東京)の健常人 61 人からの同様の報告で B2 株が 44%<sup>31</sup> であった。なお世界的には、熱帯/発展途上国と比較して温帯/先進国の方が B2 株の割合が高い傾向が認められた<sup>15,30</sup>。日本人で腸管内に phylogenetic group B2 *E. coli* が相対的に多いとすれば、それが *pks* 陽性細菌保有率の高さの一因となっている可能性がある。熱帯/発展途上国よりも温帯/先進国で、あるいはフランスよりも日本で腸管内に phylogenetic group B2 *E. coli* が多い理由は、前述したその腸管外病原性や抗菌薬耐性からは説明困難であり、他の要因があるものと推測されるが、現時点では不明である。

便から培養された *E. coli* コロニーから任意に 1 コロニーを選択した場合、それは元の便に含まれていた *E. coli* のうち最も優勢な菌株と高確率で一致すること<sup>32</sup>、*E. coli* 単一菌株から抽出した DNA に対して、3 種類のプライマー・ペアを用いた triplex PCR 法を施行することで、元の *E. coli* 株が phylogenetic group A, B1, B2, D のいずれに属していたかおおむね正確に推定できること<sup>33</sup> が知られている。従って本研究のプロトコールでも、腸管洗浄液から得られた寒天培地上の *E. coli* コロニーから 1 コロニーを選択して DNA を triplex PCR で解析することにより、各症例の *E. coli* で最も優勢な

phylogenetic group を確認することができたと思われ、この点は今後の検討課題である。

要因③： Arthur, 2012<sup>28</sup>、Buc, 2013<sup>27</sup>、いずれも大腸組織検体を用いた検討であり、粘液層内・粘膜表面・粘膜組織内の細菌の解析である。これに対し、本研究は腸管洗浄液あるいは便を用いた検討であり、粘液層内・粘膜表面・粘膜組織内の細菌も接触や粘膜剥離の過程で混入するものの、主には大腸内腔に浮遊している細菌を解析対象としている点が異なっている。大腸組織検体と便の細菌構成の差異についての既報を調べると、「腸内細菌科細菌は便よりも組織検体でより多く認められた」<sup>34</sup>、「潰瘍性大腸炎症例において腸内細菌科細菌は大腸粘膜・粘液層内よりも大腸内腔でより多く認められた」<sup>35</sup>と相反するものもある。しかし「大腸粘膜・粘液層内と大腸内腔の細菌構成の差異は症例間の差異と比較すると小さい」<sup>35</sup>とする報告が多い。なお大腸内のどの部位から入手した検体かは細菌構成に有意な影響を与えないと報告されており<sup>35</sup>、特に流動性の高い腸管洗浄液においてその傾向は顕著と予想される。また、大腸組織検体、特にサイズの小さい生検検体においてはサンプリングエラーによる偽陰性が避けがたいのに対し、便や腸管洗浄液でその懸念は少ない。しかし一方で、大腸癌などの局所病変で起こっている細菌構成の変化は、便や腸管洗浄液では希釈されてしまい過小評価となる危険がある。

また、腸管洗浄液については、便の単純な代替ではないことに留意する必要がある。ある既報では、腸管洗浄直後の腸内細菌叢変化は 20% の症例で症例間差異を凌駕し、またこの変化により腸内細菌科の上位分類群であるプロテオバクテリア門が増加する傾向にあった(ただし同報において *E. coli* は有意増減なし)が、遅くとも 14 日後にはほぼ **baseline** に復していた<sup>36</sup>。このように細菌構成が変化する要因として、(1) 腸管洗浄液による物理的な洗浄効果で、大腸内腔に主に分布する菌種は除去されやすく、大腸粘液層内・粘膜表面・粘膜組織内に主に分布する菌種は残りやすい、(2) 経口摂取された腸管洗浄液が短時間で大腸内に到達することにより本来嫌氣的であった大腸内腔に酸素が持ち込まれ、プロテオバクテリア門に多い通性嫌気性菌や好気性菌に有利な腸内環境が形成される、(3) 胆汁に含有され腸内細菌に分解される fecal serine protease が腸管洗浄に伴い大腸内腔で増加すると、serine protease inhibitor を有する一部の細菌 (*Dorea formicigenerans* など) の生存に有利に働く、などの機序が考えられる。

既報と本研究の差異のうち、要因③によるものがどの程度であるかを知るために、本来は同一症例において、内視鏡検査中に腸管洗浄液と大腸組織検体の両方を採取し、全細菌量・腸内細菌科細菌量・*E. coli* 量・*pks* 陽性細菌量を定量・比較することが望ましいと思われる。しかし、本研究では大腸の非病変部に対して生検を施行することは倫理委員会申請内容に含めておらず施行できなかった。また病変部の生検検

体に含まれる細菌を正確に解析するためには、培養法・PCR 法いずれの場合も固定処理されていない生検検体を本研究のために入手する必要があるが、それも申請に含めておらず施行できなかった。今後同様の研究を計画する場合は、これらも施行できるよう計画する必要があると考える。

また、序文で言及した 2004 年 Martin らの研究結果<sup>17</sup>では大腸癌組織において粘膜組織内に侵入した *E. coli* が正常組織よりも多いことが示唆されていたが、同研究は好気条件下の MacConkey 培地を用いた検討であるという限界に留意する必要がある。大腸癌組織内に侵入した細菌の評価として嫌気培養を併用するか、あるいは抽出した全細菌 DNA の 16S rRNA 内配列を比較検討するなどすることができれば、偏性嫌気性菌を含め大腸癌の粘膜組織内で多くみられる細菌をより網羅的に拾い上げることができるものと期待される。

最後に、統計学的観点から検出力について考察する。

表 15 に示した既報値<sup>28</sup>に基づけば、大腸癌 21 症例での *pks* 陽性率は 67%、Control 24 症例での *pks* 陽性率は 21%であり、*pks* 陽性者と陰性者における大腸癌のオッズ比は 7.6 であった。このオッズ比を前提に  $\alpha$  エラーを両側 0.05 とした場合、大腸癌 35 症例、Control 26 症例での検出力は 98%であり、従って本研究で有意差を認めなかったのは、検出力不足であるとは考えにくい。

## 便検体での検討

前述した通り、Conventional PCR における *pks* 陽性細菌 DNA の検出閾値は 1pg/ $\mu$  L であり、qPCR での *pks* 陽性細菌 DNA の定量値もそれに矛盾しない結果である。UT152・UT189 は、腸管洗浄液・便どちらで見ても全細菌に対する *pks* 陽性細菌の比が極めて低く、*pks* 陰性症例と考えられる。一方、UT191 は、便には十分に検出可能な数の *pks* 陽性細菌が存在するものの、腸管洗浄液では *pks* 陽性細菌 DNA 量が Conventional PCR での検出閾値を下回ってしまい陰性と判定されている。前項で全細菌 DNA 量が 500pg/ $\mu$  L を下回る腸管洗浄液検体を解析対象からはずすことを試みたが、その判断を支持する結果と言える。

やはり、全細菌密度の低い検体で解析の信用性が下がる点は、便と比較した場合の腸管洗浄液の欠点と考えられる。

### Ⅲ. *clbP* 遺伝子の多型の検討

*clbP* 遺伝子の全長シーケンシングについては、今回使用した 3 種類のプライマー・ペア、耐熱性 DNA ポリメラーゼ、Conventional PCR のプロトコルで問題なく行なえることが確認された。

今回、1 株 (UT081SC) において 362 番目の塩基に翻訳後蛋白のアミノ酸変異を伴う変異が確認されたが、ClbP 蛋白の理論上の活性中心とは別の部位の変異であり、その生理学的な意義は不明である。今後、ClbP 蛋白を含む、*pks island* の産物の立体構造や生理学的活性のさらなる検討が必要と考えられる。

## 結語

便あるいは腸管洗浄液を用いて *pks* 陽性細菌の有無・菌量を PCR 法で検討する方法を確立し、本邦の 172 症例から採取した腸管洗浄液を検討したところ、*pks* 陽性細菌を有する症例の割合は大腸癌、腺腫ともに Control と有意差を認めなかった。結果を修飾すると考えられる因子を除いた再検討でも有意差は見られなかった。*pks* 陽性症例では *pks* 陽性細菌の定量も行なったが有意差はなかった。

また、腸管洗浄液から分離した *pks* 陽性細菌株で、*pks island* の生理活性に重要と考えられる *clbP* 遺伝子の DNA 配列の多型を検討し、7 検体中 6 検体で同一配列であった。

今後、同一症例において下部消化管内視鏡検査時の大腸組織検体と腸管洗浄液を同時に採取して比較することで、大腸癌・腺腫の有無以外に *pks* 陽性細菌の有無・菌量に影響する因子を検討することが必要と考えられた。*clbP* 遺伝子についてはより多数の細菌株を臨床的に集積し、その多型と疾患の関連を検討することが有用と考えられた。



## 謝辞

本論文の作成にあたり懇切なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました東京大学医学部消化器内科小池和彦教授に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり以下の先生方に特に多大なるご協力を賜りましたことをここに記し、深く感謝申し上げます。

東京大学消化器内科 平田喜裕先生、鈴木伸三先生、井原聡三郎先生

その他、様々な点でご協力頂きました東京大学消化器内科の先生方に感謝いたします。

## 引用文献

- <sup>1</sup> I. Sekirov, S.L. Russell, L.C. Antunes, B.B. Finlay, "Gut microbiota in health and disease," *Physiol. Rev.* **90**, 859-904 (2010).
- <sup>2</sup> A.D. Kostic, R.J. Xavier, D. Gevers, "The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead," *Gastroenterology* **146**, 1489-1499 (2014).
- <sup>3</sup> M. Pimentel, "Normalization of lactulose breath testing correlates with symptom improvement in irritable bowel syndrome a double-blind, randomized, placebo-controlled study," *The American Journal of Gastroenterology* **98**, 412-419 (2003).
- <sup>4</sup> Motoo Uejima, Takemi Kinouchi, Keiko Kataoka, Isao Hiraoka, Y. Ohnishi, "Role of intestinal bacteria in ileal ulcer formation in rats treated with a nonsteroidal antiinflammatory drug," *Microbiol. Immunol.* **40**, 553-560 (1996).
- <sup>5</sup> J. Henao-Mejia, E. Elinav, C. Jin, L. Hao, W.Z. Mehal, T. Strowig, C.A. Thaiss, A.L. Kau, S.C. Eisenbarth, M.J. Jurczak, J.P. Camporez, G.I. Shulman, J.I. Gordon, H.M. Hoffman, R.A. Flavell, "Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity," *Nature* **482**, 179-185 (2012).
- <sup>6</sup> P.J. Turnbaugh, R.E. Ley, M.A. Mahowald, V. Magrini, E.R. Mardis, J.I. Gordon, "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest," *Nature* **444**, 1027-1031 (2006).
- <sup>7</sup> A.D. Kostic, E. Chun, L. Robertson, J.N. Glickman, C.A. Gallini, M. Michaud, T.E. Clancy, D.C. Chung, P. Lochhead, G.L. Hold, E.M. El-Omar, D. Brenner, C.S. Fuchs, M. Meyerson, W.S. Garrett, "Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment," *Cell Host Microbe* **14**, 207-215 (2013).
- <sup>8</sup> M.R. Rubinstein, X. Wang, W. Liu, Y. Hao, G. Cai, Y.W. Han, "Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin," *Cell Host Microbe* **14**, 195-206 (2013).
- <sup>9</sup> L. Flanagan, J. Schmid, M. Ebert, P. Soucek, T. Kunicka, V. Liska, J. Bruha, P. Neary, N. Dezeew, M. Tommasino, M. Jenab, J.H. Prehn, D.J. Hughes, "Fusobacterium nucleatum associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 1381-1390 (2014).
- <sup>10</sup> A.D. Kostic, D. Gevers, C.S. Pedomallu, M. Michaud, F. Duke, A.M. Earl, A.I. Ojesina, J. Jung, A.J. Bass, J. Tabernero, J. Baselga, C. Liu, R.A. Shivdasani, S. Ogino, B.W. Birren, C. Huttenhower, W.S. Garrett, M. Meyerson, "Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma," *Genome Res.* **22**, 292-298 (2012).
- <sup>11</sup> M. Castellarin, R.L. Warren, J.D. Freeman, L. Dreolini, M. Krzywinski, J. Strauss, R. Barnes, P. Watson, E. Allen-Vercos, R.A. Moore, R.A. Holt, "Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma," *Genome Res.* **22**, 299-306 (2012).

- 12 A.S. Abdulmir, R.R. Hafidh, F.A. Bakar, "Molecular detection, quantification, and isolation of *Streptococcus gallolyticus* bacteria colonizing colorectal tumors: inflammation-driven potential of carcinogenesis via IL-1, COX-2, and IL-8," *Mol. Cancer* **9**, 249 (2010).
- 13 S. Wu, K.J. Rhee, E. Albesiano, S. Rabizadeh, X. Wu, H.R. Yen, D.L. Huso, F.L. Brancati, E. Wick, F. McAllister, F. Housseau, D.M. Pardoll, C.L. Sears, "A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses," *Nat. Med.* **15**, 1016-1022 (2009).
- 14 H. Ochman, R.K. Selander, "Standard Reference Strains of *Escherichia coli* from Natural Populations," *J. Bacteriol.* **157**, 690-693 (1984).
- 15 P. Duriez, O. Clermont, S. Bonacorsi, E. Bingen, A. Chaventre, J. Elion, B. Picard, E. Denamur, "Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations," *Microbiology* **147**, 1671-1676 (2001).
- 16 D. Skurnik, A. Le Menac'h, D. Zurakowski, D. Mazel, P. Courvalin, E. Denamur, A. Andremont, R. Ruimy, "Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure," *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3062-3065 (2005).
- 17 H.M. Martin, B.J. Campbell, C.A. Hart, C. Mpofu, M. Nayar, R. Singh, H. Englyst, H.F. Williams, J.M. Rhodes, "Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer," *Gastroenterology* **127**, 80-93 (2004).
- 18 Jean-Philippe Nougayre`de, Stefan Homburg, Fre´de´ric Taieb, Miche`le Boury, Elzbieta Brzuszkiewicz, Gerhard Gottschalk, Carmen Buchrieser, Jo¨rg Hacker, Ulrich Dobrindt, E. Oswald, "*Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells," *Science* **313**, 848-851 (2006).
- 19 G. Cuevas-Ramos, C.R. Petit, I. Marcq, M. Boury, E. Oswald, J.P. Nougayrede, "*Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11537-11542 (2010).
- 20 X. Bian, A. Plaza, Y. Zhang, R. Muller, "Two more pieces of the colibactin genotoxin puzzle from *Escherichia coli* show incorporation of an unusual 1-aminocyclopropanecarboxylic acid moiety," *Chem. Sci.* **6**, 3154-3160 (2015).
- 21 E.P. Balskus, "Colibactin: understanding an elusive gut bacterial genotoxin," *Nat. Prod. Rep.* **32**, 1534-1540 (2015).
- 22 A. Cougnoux, L. Gibold, F. Robin, D. Dubois, N. Pradel, A. Darfeuille-Michaud, G. Dalmasso, J. Delmas, R. Bonnet, "Analysis of structure-function relationships in the colibactin-maturing enzyme ClbP," *J. Mol. Biol.* **424**, 203-214 (2012).
- 23 D. Dubois, O. Baron, A. Cougnoux, J. Delmas, N. Pradel, M. Boury, B. Bouchon, M.A. Bringer, J.P. Nougayrede, E. Oswald, R. Bonnet, "ClbP is a prototype of a peptidase subgroup involved in biosynthesis of nonribosomal peptides," *J. Biol. Chem.* **286**, 35562-35570 (2011).

- 24 A. Cougnoux, J. Delmas, L. Gibold, T. Fais, C. Romagnoli, F. Robin, G. Cuevas-Ramos, E. Oswald, A. Darfeuille-Michaud, F. Prati, G. Dalmasso, R. Bonnet, "Small-molecule inhibitors prevent the genotoxic and protumoural effects induced by colibactin-producing bacteria," *Gut*, Published Online First doi:10.1136/gutjnl-2014-307241 (2015).
- 25 J.R. Johnson, B. Johnston, M.A. Kuskowski, J.P. Nougayrede, E. Oswald, "Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* *pks* genomic island," *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3906-3911 (2008).
- 26 J. Putze, C. Hennequin, J.P. Nougayrede, W. Zhang, S. Homburg, H. Karch, M.A. Bringer, C. Fayolle, E. Carniel, W. Rabsch, T.A. Oelschlaeger, E. Oswald, C. Forestier, J. Hacker, U. Dobrindt, "Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family Enterobacteriaceae," *Infect. Immun.* **77**, 4696-4703 (2009).
- 27 E. Buc, D. Dubois, P. Sauvanet, J. Raisch, J. Delmas, A. Darfeuille-Michaud, D. Pezet, R. Bonnet, "High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer," *PLoS One* **8**, e56964 (2013).
- 28 Janelle C. Arthur, Ernesto Perez-Chanona, Marcus Mühlbauer, Sarah Tomkovich, Joshua M. Uronis, Ting-Jia Fan, Barry J. Campbell, Turki Abujamel, Belgin Dogan, Arlin B. Rogers, Jonathan M. Rhodes, Alain Stintzi, Kenneth W. Simpson, Jonathan J. Hansen, Temitope O. Keku, Anthony A. Fodor, C. Jobin, "Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota," *Science* **338**, 120-123 (2012).
- 29 R. Gomez-Moreno, I.E. Robledo, A. Baerga-Ortiz, "Direct Detection and Quantification of Bacterial Genes Associated with Inflammation in DNA Isolated from Stool," *Adv Microbiol* **4**, 1065-1075 (2014).
- 30 P. Escobar-Paramo, K. Grenet, A. Le Menac'h, L. Rode, E. Salgado, C. Amorin, S. Gouriou, B. Picard, M.C. Rahimy, A. Andreumont, E. Denamur, R. Ruimy, "Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates," *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5698-5700 (2004).
- 31 M. Obata-Yasuoka, W. Ba-Thein, T. Tsukamoto, H. Yoshikawa, H. Hayashi, "Vaginal *Escherichia coli* share common virulence factor profiles, serotypes and phylogeny with other extraintestinal *E. coli*," *Microbiology* **148**, 2745-2752 (2002).
- 32 G. Lidin-Janson, B. Kaijser, K. Lincoln, S. Olling, H. Wedel, "The homogeneity of the faecal coliform flora of normal school-girls, characterized by serological and biochemical properties," *Med. Microbiol. Immunol.* **164**, 247-253 (1978).
- 33 O. Clermont, S. Bonacorsi, E. Bingen, "Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group," *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4555-4558 (2000).
- 34 W. Chen, F. Liu, Z. Ling, X. Tong, C. Xiang, "Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer," *PLoS One* **7**, e39743 (2012).
- 35 A. Lavelle, G. Lennon, O. O'Sullivan, N. Docherty, A. Balfe, A. Maguire, H.E. Mulcahy, G.

Doherty, D. O'Donoghue, J. Hyland, R.P. Ross, J.C. Coffey, K. Sheahan, P.D. Cotter, F. Shanahan, D.C. Winter, P.R. O'Connell, "Spatial variation of the colonic microbiota in patients with ulcerative colitis and control volunteers," *Gut* **64**, 1553-1561 (2015).

<sup>36</sup> J. Jalanka, A. Salonen, J. Salojarvi, J. Ritari, O. Immonen, L. Marciani, P. Gowland, C. Hoad, K. Garsed, C. Lam, A. Palva, R.C. Spiller, W.M. de Vos, "Effects of bowel cleansing on the intestinal microbiota," *Gut* **64**, 1562-1568 (2015).