

課題番号 : 28-2401

研究課題名 : 腸内細菌ゲノムデータベース構築から疾患と腸内細菌との関連を解明する研究 : Human Microbiome Cohort Study (上村班)

主任研究者名 : 上村直実

分担研究者名 : 永田尚義、秋山徹

キーワード : 腸内細菌、日本人、大規模データベース、メタゲノムショットガンシーケンス
研究成果 :

背景 腸内細菌と疾患の関連み研究は、マウスを用いた基礎研究分野において盛んに行われているが、ヒトの臨床検体（糞便など）を用いた大規模な臨床研究は少ない。原因不明とされる消化管疾患には、大腸癌、炎症性腸疾患、過敏性腸症候群などがあるが、その病気の発症にある特定の腸内細菌種が関連している可能性が示唆されている。さらに、代謝疾患である糖尿病も腸内細菌との関連が報告されている。詳細な臨床情報や細菌ゲノムが明らかになっている集団から、病気との関連を明らかにしていくコホート研究が重要であるが、日本人を対象とした臨床研究は皆無である。日本人は、やせ形が多く、食習慣も特徴的であるため、欧米人と日本人では疾患発症に関連する腸内細菌種は異なる可能性がある。

目的 本研究は以下の 3 つを明らかにする。(i) 日本人において詳細な臨床情報と腸内細菌ゲノムデータを統合した 5,000 例のデータベースを構築する。(ii) 大腸疾患（大腸癌、炎症性腸疾患、大腸憩室症、過敏性腸症候群）および糖尿病と腸内細菌との関連を明らかにする。(iii) 病気の悪化（重症化、再発）と関連する腸内細菌を明らかにする。

方法 対象：消化器内科に受診し、大腸内視鏡を受診した患者。除外基準：6 か月以内に抗生剤を内服している患者。臨床情報：大腸内視鏡診断、病理診断、並存疾患（20 以上の疾患）、検査値（貧血、腎機能障害など）、CT 診断、内臓脂肪値、腹部超音波診断、体格、生活習慣（煙草、アルコール）、既往、消化管症状（過敏性腸症候群や機能性 dyspepsia など）、食事内容、運動内容、薬剤内服歴。腸内細菌ゲノム情報：DNA 抽出、ライブラリ作成、メタゲノムショットガンシーケンス。研究体制：臨床情報収集は NCGM 消化器内科の永田尚義が担当、腸内細菌ゲノム情報収集は NCGM 研究所感染制御部の秋山徹が担当、データ統合、Bioinformatics、研究プロトコルの指導には、東大柏服部研究所の須田亙、西嶋傑、服部正平が担当。

結果 (2016 年) (i) NCGM の便 DNA 抽出の妥当性を検証した。NCGM で集めた糞便 DNA 90 例を服部研で解析したところ、服部研のデータと異なっており、DNA 抽出の変更する必要性が判明した。そのため、DNA 抽出およびシーケンスを服部研と同様のプロトコールで行うこととなった。解析プロトコールの変更後、80 例で確認したところ NCGM データと服部研のデータとの間に極めて高い相関性を示した。(ii) NCGM の糞便容器と下剤使用が腸内細菌に与える影響を調べる研究を立ち上げ、サンプル収集を行った。2016 年 7 月に倫理委員会の承認を得て、12 月に糞便サンプルを収集が完了、現在解析中である。(iii) 糞便サンプルを 2900 例収集した。この 2900 例のデータベースは詳細な臨床情報がすでに統合されているものである。そのデータベースから健常者 450 例のサンプルを選定し、現在 DNA 抽出およびショットガンシーケンス解析を行っている。80 検体分のプレリミナリーデータでは、年齢、飲酒、一部の食習慣（米摂取頻度、野菜摂取頻、果物摂取頻度）で腸内細菌のばらつきが見られた。一方、性別ではばらつきは認めていない。2017 年度は、さらに解析症例を増やし、疾患と腸内細菌との関連を中心に発表する予定である。

Subject No. : 28-2401

Title : The GUT microbiome of Japanese and its associated with several diseases: Human Microbiome Cohort Study.

Researchers : Naomi Uemura, Naoyoshi Nagata, Toru Akiyama

Key word : Japanese GUT microbiome database construction, Metagenome shotgun sequence

Abstract

Background: Several studies have shown an association between GUT microbiome and disease, but few studies have focused on the GI disease in a large sample size and analyzed by shotgun sequencing of fecal DNA samples. To date, there are many unknown causes of GI diseases such as colorectal cancer, inflammatory bowel disease (IBD), irritable bowel syndrome (IBS), and GUT microbiome may affect these disease development. In addition, recent western studies have suggested that specific GUT microbiome was associated with diabetes mellitus. However, no large study from Japanese population focused on GUT microbiome associated with disease. Japanese have unique dietary culture, exhibit the highest average life span, and very low body mass index (BMI), therefore may have unique GUT microbiome compared with Western people.

Aims: This study aimed to (i) construct the Japanese GUT microbiome database including detailed clinical and genome information. (ii) identify the association of GUT microbiome with colorectal disease (colorectal adenoma, cancer, IBD, IBS, colonic diverticulosis), and diabetes mellitus. (iii) elucidate the specific GUT microbiome associated with the worsening of the disease (severity or recurrence).

Methods: Patients who underwent colonoscopy at the NCGM and gastroenterology department were prospectively included. Patients with use of antibiotics within 6 months were excluded. Clinical variables included colonoscopic diagnosis, pathological diagnosis, co-morbidities (≥ 20), laboratory data (anemia, renal function, etc), CT diagnosis, visceral fat value, abdominal US diagnosis, BMI, smoking or alcohol, past-history, GI symptoms (IBS, functional dyspepsia, etc), dietary habits, physical activity, and medications. GUT microbiome was assessed by sequencing of fecal DNA samples using next generation sequence (metagenome shotgun sequence).

Results (2016) (i) Determination of DNA extraction protocol. We evaluated the fecal DNA extraction in NCGM protocol compared with Hattori protocol (DNA Research, 2016, 23, 125). The GUT microbiome composition from NCGM DNA sample was quite different than that from previous Japanese data (DNA Research, 2016, 23, 125). Therefore, we decide to change the DNA extraction protocol. Then, we re-extracted the DNA using new 80 fecal samples based on the Hattori protocol, and high correlation of GUT microbiome was confirmed between NCGM DNA sample and previous Japanese data. (ii) Validation of NCGM fecal sample collection. We examined whether feces container or intestinal lavage use influences GUT microbiome composition. The study was approved by the ethics committee of the NCGM in July 2016, and sample was stated to collect. Twenty healthy volunteers participated in this study, and fecal samples were currently under analysis. (iii) During the study period, we recruited the 2,900 subjects with 8,700 fecal samples who underwent colonoscopy. We constructed clinical database including colonoscopic diagnosis and patient background. Of the 2900 cases, we selected 450 healthy subjects, and metagenome shotgun sequence was performed. Preliminary data of 80 cases revealed that advancing age, alcohol drinking, and the dietary habits (rice, vegetable, fruit intake) affect the GUT microbiome composition, but the sex difference was not observed. We have planned to collect more fecal samples and analyze the association between GUT microbiome and GI diseases.

Researchers には、分担研究者を記載する。

課題番号 : 28-2401

研究課題名 : 腸内細菌ゲノムデータベース構築から疾患と腸内細菌との関連を解明する研究 : Human Microbiome Cohort Study (上村班)

主任研究者名 : 上村直実 分担研究者名 : 永田尚義、秋山徹

- 2017年5月に発足
- 2017年6月の班会議で、以下の問題点が挙げられた。

- ① 糞便検体収集、臨床情報の収集の流れは確立しているが、糞便容器に培地がはいており、培地入りの容器は腸内細菌の影響はないのか。
 - ② 糞便検体のDNA抽出方法が世界標準と異なる方法で行っているが、結果が異なる可能性はないか。
 - ③ DNA抽出後のメタゲノムショットガンシーケンスの方法
 - ④ 臨床データと細菌ゲノム情報と統合ビックデータのbioinformatics
- ③、④の問題点を解決するため、服部正平氏(腸内細菌研究の第一人者)と共同研究体制を構築した(下図)。また、①、②に関しても服部研にプロトコールの相談を行った。

糞便サンプル収集と臨床情報収集 : NCGM 消化器内科 永田尚義

細菌ゲノム抽出とシーケンス(メタゲノムショットガンシーケンス) : NCGM研究所感染制御部 秋山徹

バイオインフォマティクス (アセンブリ、細菌遺伝子予測解析、細菌機能予測解析) : 東大柏 服部研

須田亙(協力者):ゲノムデータの統計処理(バイオインフォマティクス)、サンプル収集の指導、DNA抽出の指導
西嶋傑(協力者):ゲノムデータの統計処理(バイオインフォマティクス)
服部正平(協力者):統計処理の指導、サンプル収集の指導、DNA抽出の指導

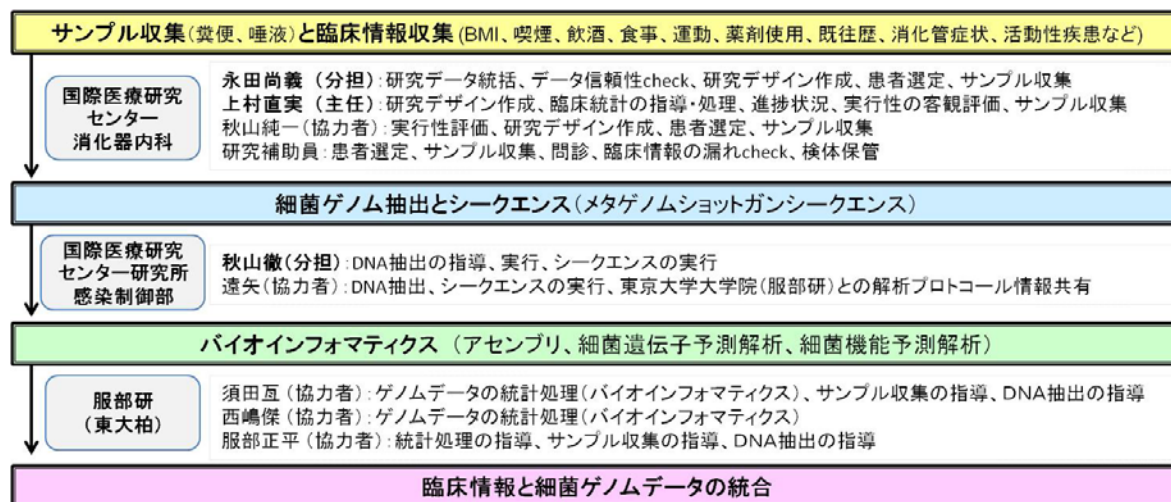
- **問題点①NCGM便採取方法に関する妥当性に関して。**便採取方法、便容器(空容器と培地入り以容器)、下剤使用が腸内細菌叢に与える影響を調べる研究を立ち上げ、7月に倫理委員会の承認を得た、2016年12月より開始。現在解析中である。
- **問題点②NCGMの便DNA抽出法に関して。**NCGMサンプルでQiaen kit DNA抽出した90例を服部研で酵素法DNA抽出した106例の腸内細菌叢を調べたところ、全く相関がみられなかった。NCGMサンプルを酵素法でDNA抽出し直すと高い相関性が見られた。2016年12月より、DNA抽出法をやり直し、現在1001検体のDNA抽出が終了し、458検体のショットガンシーケンスが終了している。
- 2017年5月までに、2900例の糞便サンプル収集した。同時に臨床情報収集、問診票収集の統合が終了している。次年度はまず、2900例のうち健常者450例において、食事、運動、生活習慣と腸内細菌叢との関連を明らかにする。さらに、原因不明の大腸疾患である炎症性腸疾患、過敏性大腸炎、大腸憩室症と腸内細菌叢との関連、代謝疾患である糖尿病や肥満症と腸内細菌叢との関連、さらに、腸内細菌に影響を及ぼすと考えられる酸分泌抑制薬、整腸剤、抗生剤と腸内細菌叢との関連を明らかにしていく。
- **健常者80例のプレリミナリーデータ (糞便のメタゲノム情報との相関係数)**

	米	パン	麺	野菜	果物	魚介	肉	加工肉
Genus	0.05195	0.6553	0.3417	0.02797	0.03297	0.1888	0.1778	0.4745
Species	0.002997	0.2398	0.7712	0.06993	0.007992	0.5514	0.2977	0.3467

課題番号 : 28-2401
 研究課題名 : Human Microbiome Cohort Study : 臨床情報解析班
 主任研究者名 : 上村直実
 分担研究者名 : 永田尚義

キーワード : 腸内細菌、日本人、大規模データベース、メタゲノムショットガンシーケンス
 研究成果 :

<班構成の確立> 下記の図のような役割と研究の流れを構築した



<臨床情報収集に関しての進捗状況>

・2017年5月30日までに、2,900例の糞便サンプルおよび臨床情報のデータ統合を行った。

<日本人健常成人における腸内細菌メタゲノム解析研究の進捗状況>

データベースから並存疾患や症状などの詳細な臨床情報を評価し、健常者の定義に当てはまる450例を抽出。健常者450例の年齢、性別、BMI、食習慣、運動習慣などと腸内細菌叢との関連を明らかにする。日本人健常人の腸内細菌叢は、すでに服部研において研究がおこなわれている (DNA Res. 2016 Apr;23(2):125-33.) が、症例数が106例と少ないこと、日本人の平均年齢よりも若年であること。食事などとの影響が分かっていないこと。などがあり、新知見になりうると考えている。また、服部研には世界の健常者腸内細菌叢データベースがあり、こちらと比較することも可能である。現在、DNA抽出が終了し、ショットガンシーケンスの結果待ちの状態である。その結果と臨床データを統合し(ビックデータ)、bioinformatics解析を行う。2017年度中に論文化の予定である。

<便採取タイミング、糞便検体容器、下剤使用が腸内細菌叢に与える研究の進捗状況>

倫理委員会承認2016年9月、2016年12月からサンプル収集をおこない8例の健常者がinclusionされた。さらに、2017年4月より validated cohort として11例のサンプル収集を行い、現在DNA抽出とシーケンスをおこない、bioinformatics解析中である。2017年度に論文化をめざす。

本研究では以下の3つを明らかにする。

- ①保管方法による腸内細菌とメタボロームの変化: すぐに冷凍保管と、室温4度で1日放置して保管と3日放置して保管、室温25度で1日放置して保管と3日放置して保管した場合で検討
- ②便容器(培養液なしとあり)の違いによる腸内細菌の変化
- ③下剤の影響による腸内細菌変化とメタボローム変化: 2Lの下剤内服前、下剤直後、下剤14日後、下剤28日後で検討

研究目的

1. 日本人の腸内細菌ゲノムデータベースを構築する
2. 大腸疾患リスク、糖尿病リスクを腸内細菌から明らかにする
3. 病気の悪化(重症化、再発)と関連する腸内細菌を明らかにする

これまで行ったこと

- プロトコール改善後の検討
- サンプルング採取からDNA抽出工程までの諸条件における細菌叢への影響の評価
- メタゲノム情報と基本情報および食事の相関解析

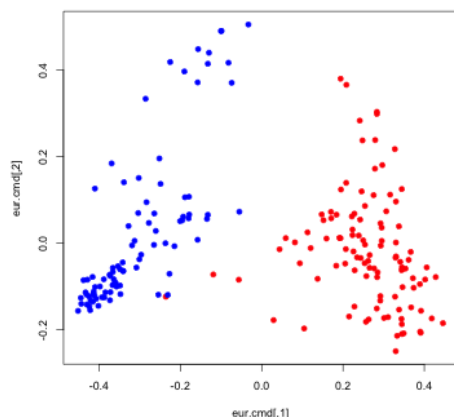
プロトコール改善後の検討

- DNA抽出法: 服部研の酵素法に変更
- 取得データ量: 0.2Gから1Gへ変更

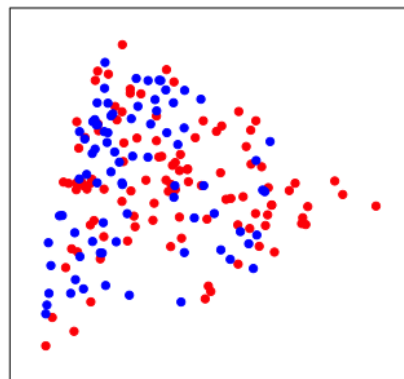
➡ 服部研106人の日本人データと80人のNCGMデータの比較

- NCGM 90名
- 東京大学 106名

前回の成績




今回の成績



東大の方法と同じ方法でDNA抽出を行ったところデータの相関性が改善された

現在の解析状況

- DNA抽出済みの検体数：1001検体
- DNAデータの取得済みの検体数：458検体

 80検体分のデータを用いて相関解析へ

メタゲノム情報との相関解析

解析項目

	年齢	性別	BMI	体重	身長	飲酒の有無	飲酒の頻度	喫煙の有無	抗菌剤の有無
Genus	0.00799	0.1249	0.4775	0.2218	0.06993	0.04595	0.01798	0.4076	0.004995
Species	0.001998	0.1149	0.6703	0.1908	0.01099	0.004995	0.002997	0.5604	0.01499

解析項目

	米	パン	麺	野菜	果物	魚介	肉	加工肉
Genus	0.05195	0.6553	0.3417	0.02797	0.03297	0.1888	0.1778	0.4745
Species	0.002997	0.2398	0.7712	0.06993	0.007992	0.5514	0.2977	0.3467

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 28-2401

研究課題名： 腸内細菌ゲノムデータベース構築から疾患と腸内細菌との関連を解明する研究：Human Microbiome Cohort Study

主任研究者名： 上村直実

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
なし				

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
なし				

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
腸内細菌大規模データベース化	永田尚義	毎日新聞	新聞誌	2016年9月23日

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこ