



Subject No. : 29-1025

Title : Development of new predictive marker of pancreatic cancer using oral microbiome and metabolome

Researchers : Yuya Hisada, Suguru Nishijima

Key word : Oral micorbiome, Oral metabolome, pancreatic canecr, metagenome analysis

Abstract :

Recent studies have shown that oral microbiome is associated with GI diseases, as well as intestinal microbiome. A few studies from western countries have suggested an association between oral bacteria analyzed by metagenomic sequence and pancreatic cancer, but there are some issues with small number of cases, methodology of sampling or DNA extraction, and not Japanese subjects. Therefore, we included only Japanese subjects with pancreatic cancer and age, sex, and important risk factors matched controls. We aimed to identify the specific oral microbiome and microbiota-generated metabolites that associated with pancreatic cancer.

Firstly, we constructed an analytics platform consisted of clinical team, sample analytic team, and bioinformatics team.

In clinical team

Feces and saliva for microbiome and metabolome analysis were collected from subjects with pancreatic cancer and non-pancreatic cancer controls who underwent abdominal CT. We created a database using CT information, questionnaire, medical records. No significant difference of clinical factors was found between pancreatic cancer and controls (Table 1).

Table 1.

	Pancreatic cancer	Control
Age	74.2 years	72.1 years
Male	50%	48%
Height	159.8cm	160.2cm
Body Weight	55.8Kg	60.5Kg
Alcohol	42.3%	39.4%
Smoking	13%	18%

In analytic and bioinframtics team

We constructed a protocol of DNA extraction for oral microbiome analysis in NCGM. We found that amount of sample and DNA extraction were not significant difference between pancreatic cancer and controls (Table 2).

Table 2

	Pancreatic cancer	Control
Amount per sample	319 ul	269ul
DNA extraction amount	119.6ng/ul	109.3 ng/ul

Researchers には、分担研究者を記載する。

課題番号: 29-1025

研究課題名: 唾液の細菌メタゲノム解析とメタボローム解析から膵癌予測マーカーを明らかにする臨床研究

主任研究者名: 久田裕也 分担研究者名: 久田裕也、西嶋傑

### これまでの経過

2017年4月 研究費取得

2017年4月 研究体制構築 (下記図)

2017年10月 膵癌発生リスクを細菌ゲノムから解明する研究 多施設共同研究の倫理委員会承認 (承認番号2083)

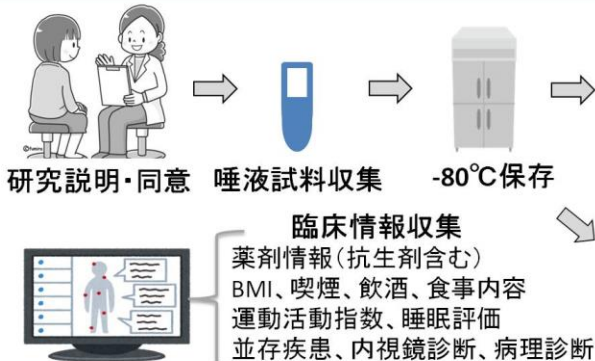
2018年4月 口腔内細菌DNA抽出にかんしてNCGM解析プロトコルの構築

2018年6月 目標症例数の半分で、膵癌症例、コントロールで腸内細菌、口腔内細菌の中間解析を予定

### 研究組織と役割: 一連の解析プラットフォーム

#### 臨床班

国際医療センター消化器内科(申請者)



#### サンプル解析班

(西嶋傑、秋山徹)

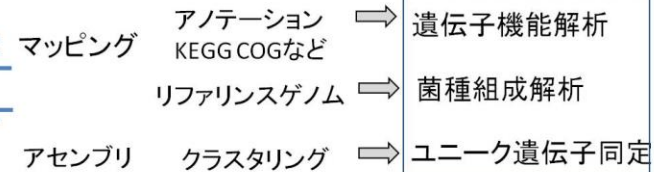


慶應義塾大学先端生命科学研究所(福田真嗣)

症例を選定し、CE-TOFMSにて水溶性イオン性化合物解析

#### バイオインフォマティクス班

早稲田(西嶋傑、服部正平)



情報統合  
統計解析

## 臨床班の進捗

これまで膵癌症例、コントロール症例の糞便、唾液サンプルを収集した。臨床情報をデータベース化した(下記図)。膵癌症例とコントロール症例で臨床因子に有意差は認めてない。

	膵癌	コントロール
年齢	74.2歳	72.1歳
性別(男)	50%	48%
身長	159.8cm	160.2cm
体重	55.8Kg	60.5Kg
アルコール摂取	42.3%	39.4%
喫煙	13%	18%

## 解析班の進捗

唾液サンプルから口腔内細菌解析のためのNCGM解析プロトコルを構築した。サンプル量、DNA抽出量共に膵癌症例とコントロール症例に有意差を認めていない

	膵癌	コントロール
サンプル量	319 ul	269ul
DNA抽出量	119.6ng/ul	109.3 ng/ul

課題番号 : 29-1025  
研究課題名 : 唾液の細菌メタゲノム解析とメタボローム解析から膵癌予測マーカーを明らかにする臨床研究: バイオインフォマティクス班  
主任研究者名 : 久田裕也  
分担研究者名 : 西嶋傑

キーワード : メタゲノム解析、膵臓癌

研究成果 :

膵癌症例と非膵癌コントロール症例における唾液、糞便を収集した。  
糞便からの腸内細菌の DNA 抽出や解析プロトコールはすでに当院で構築しているが、口腔内細菌の解析は初めてであり、NCGM の DNA 抽出プロトコールを構築した。

①まず、これまで唾液検体から口腔内 Microbiome の研究報告を多数行っている共同研究施設の東京大学服部研で口腔内細菌の解析を行った。

膵癌症例とコントロール症例からそれぞれ唾液抽出量、DNA 抽出量を測定した。

②次に、NCGM で DNA 抽出を行った。

唾液検から DNA の抽出法は以下の方法で行った。

サンプル採取保存

1. 1ml 程度の以上の唾液を、15ml チューブに採取
2. 採取した唾液検体は、ただちに $-80$  度冷凍庫に保存

DNA 抽出

1. 氷上でゆっくり融解し、1ml を新しい 5ml チューブに取り分ける。
2. 3ml の PBS を加えて良く混合し、遠心し上清を捨てる。
3. チューブに 3ml TE10 を加えて遠心し、上清を捨てる。
4. ペレットに  $800\ \mu\text{l}$  TE10 を入れて懸濁する。
5. Isozyme を  $50\ \mu\text{l}$  添加し、振盪しながらインキュベートする (37 度 1 時間)
6. Achromopetidase を  $20\ \mu\text{l}$  添加し、振盪しながらインキュベートする (37 度 30 分)
7. 20%SDS を  $50\ \mu\text{l}$  ProteinaseK を  $10\ \mu\text{l}$  添加し、振盪しながらインキュベートする (55 度 1 時間)
8. フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを 1ml 添加しボルテックスし、延伸し上層を新しい 2ml チューブに回収する。
9. 3M 酢酸ナトリウム  $100\ \mu\text{l}$ 、イソプロパノール 1ml を添加し遠心、上清を捨てる。
10. 75%エタノール 1ml を添加し遠心、上清を捨てる。
11. ペレットを風乾させる
12.  $1\times\text{TE}$  を  $500\ \mu\text{L}$  を入れ、タッピングしてよく DNA を溶かした後 2ml チューブに移す。

③膵癌症例とコントロール症例の間で DNA 抽出量は有意差は認めなかった (下記図)

	膵癌	コントロール
サンプル量	319 ul	269ul
DNA抽出量	119.6ng/ul	109.3 ng/ul

この結果は、服部研で行った DNA 抽出量とも変わらないことが判明し、NCGM の口腔内細菌解析プロトコールを構築することができた。

今後、さらに症例を増やして目標症例数の半数に達した段階で中間解析を行う予定である。

## 研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 29-1025

研究課題名： 唾液の細菌メタゲノム解析とメタボローム解析から膀胱癌予測マーカーを明らかにする臨床研究

主任研究者名： 久田裕也

### 論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
該当なし				

### 学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
該当なし				

### 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
該当なし				

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
該当なし				

※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と。