

機関番号：14501
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21890138
 研究課題名（和文）メタゲノム解析およびメタボローム解析を用いた総合的大腸がん診断システムの開発
 研究課題名（英文）Comprehensive diagnosis system for colon cancer using metagenome and metabolomics
 研究代表者
 吉田志栄（YOSHIDA Shiei）
 神戸大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号：30514955

研究成果の概要（和文）：

大腸がんは近年、食生活の欧米化による腸内細菌叢の変化がその要因となり、その発症率が増加してきていると認識されている。このことから、研究代表者は、腸内細菌叢には大腸がんに関する情報が集積されており、腸内細菌叢についての解析が急務であると考えた。そこで本提案課題では、大腸がん患者の糞便を用いて腸内細菌叢のもつ遺伝子情報を明らかにし（メタゲノム解析）、さらには腸内細菌叢の代謝産物の変動を解析する（メタボローム解析）ことで得られた研究成果を基に、将来的な大腸がんの早期診断システムの開発を目指す。

研究成果の概要（英文）：It has been recognized that the incidence of colorectal cancer is recently increasing due to changes in intestinal flora by dietary habits of the Western-style food. Therefore, we considered that the information about colorectal cancer integrated in the intestinal flora and the analysis of intestinal flora is urgent. In this study, the genetic information of the intestinal flora was investigated using a stool of patients with colorectal cancer (metagenomic analysis) and furthermore the variation of metabolites in the intestinal flora (metabolomic analysis) was examined. Based on the results obtained from metagenomic analysis and metabolomic analysis, we tried to develop the novel early diagnostic method for colorectal cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：大腸がん、メタボロミクス、メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は近年、日本人の死亡原因の第1

位となっている。中でも全がん患者の死亡率統計(2004年度)では、大腸(結腸・直腸)がん

(死亡率 男性：第4位 女性：第1位)は最も死亡頻度の高いがん種に挙げられている。多くの疫学調査から、大腸がんの発生には食事の欧米化（高タンパク・高脂肪・低食物繊維食）などの生活習慣の変化が関与していることが示されており、それに伴う腸内細菌叢の変化も要因のひとつと考えられている。このように、腸内細菌の変化に伴う宿主応答機構の変化は大腸がんを含むさまざまな消化管疾患に関与することが示唆されている。しかしながら、腸内細菌と宿主の相互作用を包括的に解析する研究システムの構築がなされていないため、その詳細は不明である。

腸内細菌は少なくとも200属、800種以上の複雑な細菌集団によって構成され、その80%またはそれ以上が培養不可能であるため、その実体と機能が明らかではなく、その詳細は不明である。最近の技術革新において、腸内細菌叢の遺伝子組成をバイアスなく解析できるメタゲノム解析が開発された。この方法は細菌叢の全ゲノムシーケンスと得られた配列データのコンピュータ解析からなり、培養の可否に関係なくそこに存在する遺伝子を広範囲に解析できるシステムであり、従来の培養や16S領域など一部の解析だけでは不可能な腸内細菌叢の遺伝子組成と機能特性の解明が期待されている。

また、近年、画期的なタンパク質解析や代謝産物解析技術が開発され、さまざまな代謝産物が短時間で解析できる技術（メタボリックフィンガープリンティング）、ならびに、その分類・判別に寄与したピークを検索して化合物を同定する技術（メタボライトプロファイリング）などが可能となった。生命の設計図は遺伝子から構成されているが、実際には多くのタンパク質、代謝産物とその生命活動を担っているため、各種疾患における代謝産物の変化は遺伝子の発現量よりも、ダイナミ

ックであると想定される。このため、メタゲノム解析を用いた腸内細菌叢の解明に加えて、腸内細菌叢によるタンパク質以外の細胞内低分子の量的質的な変動に対する代謝分子の総体の解析（メタボローム解析）が必要になると思われ、この分野を自分の研究分野に応用しようと着想した。

2. 研究の目的

本提案ではこれらの新たな技術背景を基に、大腸がんの患者の腸内細菌叢のメタゲノム解析、ならびに、質量分析装置を用いた糞便および血清中のメタボリックフィンガープリンティングを行う。これらの基盤データを足がかりにして腸内細菌叢の変化、その代謝産物が宿主に及ぼす影響を明らかにすることで、宿主免疫応答のクロストークを分子レベルで解明し、大腸がんの発症機序を明らかにする。現在、神戸大学大学院医学研究科質量分析総合センターに配置されているメタボローム解析システムは定量性が高いため病態や薬剤効果などをより正確に把握できる可能性があり、超早期診断や治療効果判定に大きな威力を発揮することが期待されている。本研究は、ヒト-細菌間相互作用に深く関与する腸内細菌の遺伝子と遺伝子産物、代謝物と代謝経路を明らかにし、これらの分子や代謝経路、ならびに、これらを有する細菌種をターゲットとした創薬デザインによるプロバイオティクスを含めた医薬品等による大腸がんの治療および予防法の開発、診断バイオマーカーの開発によるスクリーニング検査法の確立を目指す。

3. 研究の方法

課題I：糞便を用いたメタボリックフィンガープリンティングシステムの確立

腸内細菌は少なくとも 200 属、800 種以上の複雑な細菌集団によって構成され、その 80%、またはそれ以上が培養不可能であるため、健常人においても腸内細菌の実体と機能が明らかではない。また、糞便中の食事由来の成分と腸内細菌による代謝産物との鑑別も必要となる。そのため、同一健常人の糞便を、食事内容を変えて数回採取することにより、その影響を調べる。具体的には、提供された健常人の糞便を脂溶性化合物と水溶性化合物に分けて抽出し、得られた抽出液をクロマトグラフ質量分析計により網羅的に解析する。得られたクロマトグラムについて主成分分析により比較解析を行う。

課題 II: 大腸がん患者の糞便および血清を用いたメタボリックフィンガープリンティング解析

課題 I と同様にクロマトグラムのパターン解析を行うことで、健常人と大腸がん患者を比較し大腸がん患者にのみ存在するピークを抽出する。その結果を LC/MS に対するライブラリー検索によりピーク同定を行うことで、大腸がん特異的バイオマーカーの探索を実施する。ライブラリー検索で該当する化合物が決定できなかった場合においても、得られたクロマトグラムを網羅的にパターン解析するメタボリックフィンガープリンティングを行うことにより、大腸がん患者の判別に寄与したピークを探索する。その結果を MALDI-TOF2-MS ならびに LCMS-IT-TOF による MS/MS 解析することによりピークを構成する物質を特定し、大腸がん特異的バイオマーカーを明らかにする。また、共同研究者である東京大学大学院新領域創成科学研究科の服部正平教授に課題 II で用いた大腸がん患者および健常人の糞便を提供し、腸内細菌叢のメタゲノム解析を実施する。

課題 III: メタボリックフィンガープリンティング、メタゲノム解析を用いた総合的大腸がん診断システムの開発

課題 II で得られたメタボリックフィンガープリンティングの結果と、共同研究施設である東京大学大学院新領域創成科学研究科にて行うメタゲノム解析の結果を総合して考察することにより、大腸がんの発症による一連の代謝産物や腸内細菌叢の変動をパターン解析する。このことから得られた成果により、ヒト-細菌間相互作用に深く関与する腸内細菌の遺伝子と遺伝子産物、代謝産物と代謝経路を明らかにし、これらの分子や代謝経路およびこれらを有する細菌種をターゲットとした創薬デザインによるプロバイオティクスを含めた医薬品等の治療法、診断バイオマーカーの開発を目指す。また、無作為に抽出した人から提供いただいた糞便および血清からメタボリックフィンガープリンティングおよびメタゲノム解析を行い、その結果と内視鏡検査等による診断結果により、大腸がん罹患しているか否かを検査し、スクリーニング検査としての感度および特異度を調べる。また、その結果を、現在、主に用いられている大腸がんのスクリーニング検査である便潜血検査と感度、特異度について比較する。また、費用対効果等も検討し、糞便のメタボリックフィンガープリンティングならびにメタゲノム解析を用いた大腸がんスクリーニング検査の有用性を明らかにする。

4. 研究成果

臨床サンプルを用いた前処理条件・分析機器条件・データ解析手法の最適化をはかった。臨床サンプルが含有する低分子代謝物の多様性・複雑性を考慮し、主な分析機器として

はガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS) を用いて検討した。水/メタノール/クロロホルム混合溶媒を用いて水溶性/脂溶性代謝物を回収し、(Blight & Dyer 法)、誘導体化処理を行った後に GCMS による測定に供した。さらに、解析に必要なサンプル量の検討を行った。血清のメタボローム解析においても、血清必要量や GCMS 測定条件の検討、さらには、データ解析手法を検討し、血清メタボローム解析手法を確立した。そこで、適切なインフォームドコンセントのもと、大腸がん患者の治療前後での血清、ならびに、尿を提供していただき、GC/MS を用いた比較解析を実施しており、治療前後で変動する代謝産物をいくつか同定した。現在、メタゲノム解析から得られた腸内細菌叢の変動結果と代謝産物の変動結果との相関関係について詳細に検討している段階であり、今後、得られた解析結果と、大腸がんの進行度、悪性度などの臨床的カテゴリーとを照らし合わせることで、大腸がん特異的な代謝産物の変動パターンを明らかにするとともに、メタボリックフィンガープリンティングの手法の超早期診断としての適用性について検討する。

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 1 件)

1. Predictors of malignant intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. Mimura T, Masuda A, Matsumoto I, Shiomi H, Yoshida S, Sugimoto M, Sanuki T, Yoshida M, Fujita T, Kutsumi H, Ku Y, Azuma T. J Clin Gastroenterol. 2010 Oct;44(9):e224-9.

[学会発表] (計 4 件)

1. 平成 21 年 5 月消化器内視鏡学会総会:胆管深部挿管困難例に対する膵管ステント併用プレカットの有用性、安全性に関する

検討。吉田志栄、久津見弘、佐貫毅、石田司、吉中勇人、田中擴址、鎮西亮、塩見英之、信谷健太郎、増田充弘、奥野達哉、矢野嘉彦、森田圭紀、吉田優、瀬尾靖、豊永高史、井口秀人、東健

2. 平成 21 年 5 月消化器病学会総会:当院における ERCP 後膵炎の現状。吉田志栄 久津見弘 船津英司 佐貫毅 塩見英之 信谷健太郎 増田充弘 森田圭紀 矢野嘉彦 吉田優 瀬尾靖 豊永高史 井口秀人 東健
3. 平成 21 年 9 月胆道学会:胆道再建術後症例に対する内視鏡的胆道関連手技についての検討。吉田志栄 久津見弘 杉本真樹 小畑大輔 古松恵介 吉中勇人 塩見英之 信谷健太郎 増田充弘 佐貫毅 具英成 東健
4. 平成 21 年 10 月 J-DDW:当院における ERCP 後膵炎の現状とその対策。吉田志栄 久津見弘 佐貫毅 塩見英之 信谷健太郎 増田充弘 森田圭紀 矢野嘉彦 吉田優 瀬尾靖 豊永高史 井口秀人 東健

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/gi/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田志栄 (YOSHIDA Shiei)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 30514955

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし