

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Rare/Intractable Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) 生体試料(糞便や腸管粘膜等)のサンプリング法や解析法(特にメタゲノムならびにメタボローム解析)の標準化と臨床情報を含む統合的情報基盤の構築
(英語) Standardization of the sampling and analytical methods (metagenome and metabolome analyses using stool and intestinal mucosa etc.) and establishment of comprehensive database of information about metagenome/metabolome data and clinical data
- 研究開発担当者 (日本語) 国立がん研究センター研究所 がんゲノミクス研究分野 ユニット長 谷内田真一
- 所属 役職 氏名： (英語) National Cancer Center Research Institute, Division of Cancer Genomics Laboratory head, Shinichi Yachida
- 実施期間： 平成 28 年 11 月 8 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語)
開発課題名： (英語)
- 研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

(1) 生体試料の収集

本研究開発開始後も継続して、研究開発担当者が国立がん研究センター・中央病院の内視鏡科で大腸内視鏡検査を受ける患者を対象にインフォームド・コンセントを行い、糞便試料（凍結糞便ならびにグアニジン・チオシアン酸溶液を用いた室温保存便）を収集し、平成 28 年度末までに、総計で 2,000 名以上の糞便試料を収集することが出来た。さらに既登録者の 2 回目以降の糞便試料の収集を行った。他施設（医薬基盤・健康・栄養研究所と東京医科歯科大学）からの研究試料（糞便）を受け入れ、国立がん研究センター・研究所でバンキングを行った。

(2) 「生活習慣などに関するアンケートの実施」

研究開発担当者が国立がん研究センター・中央病院の内視鏡科で大腸内視鏡検査を受ける患者を対象にインフォームド・コンセントを行い、糞便試料の収集とともに、主に食生活に関する質問から構成されている「生活習慣などに関するアンケート」を実施した。被験者は大腸内視鏡検査前の腸管洗浄剤の内服中に記載している方が多い。しかし、25 ページ、475 項目に及ぶ質問のため（約 1～2 時間を要する）、高齢者には自宅で回答して郵送していただき、ほぼ 100%の被験者から「生活習慣などに関するアンケート」を回収できた。これらのアンケート調査は、匿名化後に業務委託会社（教育ソフトウェア）で数値化した。

(3) 大腸内視鏡検査所見、診療データや画像情報等の臨床情報の収集

本研究開発課題では、全症例が大腸内視鏡検査を受ける。したがって、大腸内視鏡検査を受けるにあたり、紹介先からの診療情報、既往歴等の問診、ならびに血液・生化学検査、特に画像診断等の臨床情報が附随している。本研究開発開始後の約 350 例の新規登録者に対し、大腸内視鏡検査所見に加えて、これらの診療データや画像情報等の臨床情報を収集した。さらに既登録者の診療情報も、大腸内視鏡検査等で中央病院を受診毎にアップデートを行った。

(4) メタゲノム解析とメタボローム解析

平成 28 年度は大腸内視鏡検査の受検者の中でも健常者と考えられる方に、研究参加の依頼を積極的に行った。疾患（大腸がんなど）を有する患者の腸内環境を検討するためには、そのリファレンスとなる日本人健常者のメタゲノム解析とメタボローム解析の結果が必須である。平成 28 年度は、123 名のメタゲノム解析用の DNA 抽出を行った。DNA 抽出法は MetaHIT（Metagenomics of the Human Intestinal Tract）の最新版に基づいて、ビーズ法で行った。

(5) 統合的情報基盤（データベース）の構築

研究開発代表者は、研究開発分担者である東京工業大学の山田拓司や水谷紗弥佳とともに、東京工業大学のデータサーバーを拡充し、データベースセンターを構築した。東京工業大学では山田拓司が管理者となり、①「生活習慣などに関するアンケート」、②大腸内視鏡検査所見、③診療データ、④臨床画像等の臨床情報をデータベースセンターへの登録を開始した。メタゲノム解析ならびにメタボローム解析が実施された登録者に関しては、それらの解析データも登録し、多角的マルチオミックス解析の整備を行った。

(6) 生体試料のサンプリング法と解析の標準化

研究開発課題では、糞便からの DNA 抽出やメタゲノム解析は、MetaHIT と全く同じプロトコルで行ってきたため、日本と欧州の研究機関との間でデータの比較は可能であるが、米国・

HMP (Human Microbiome Project) のプロトコルで解析されたデータとは、単純には比較できない。本研究開発課題の採択後に、AMED において笹川千尋 AMED・CREST 研究開発総括や大野博司 研究開発副総括を中心に、AMED・CREST アドバイザー、AMED「医と食」、企業コンソーシウムと有識者で微生物叢解析の標準化に関する議論を 1 回/月のペースで行った。

(1) Collection and banking of samples

Shinichi Yachida, who is a principal investigator, obtained informed consent from research subjects, who undergo colonoscopy at the National Cancer Center Hospital, and collected fecal samples (frozen on dry ice and stored at room temperature in test tubes containing 4M guanidine thiocyanate solution). The number of subjects, who enrolled the project, is >2,000 by the end of fiscal 2016. The subset of the subjects offered the samples more than once at a periodic inspection. National Cancer Center Research Institute also collected samples from other sample donor institutions (1. National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition and 2. Tokyo Medical and Dental University).

(2) Conduct of a questionnaire on life style

Shinichi Yachida also took a questionnaire on life style, especially dietary habit, from the subjects along with fecal samples. The questionnaire contains 475 questions on 25 pages and it takes 1-2 hours to complete the questionnaire. Most of subjects complete it during oral administration of bowel-cleansing agent at the hospital, but elderly subjects were asked to complete it at home and send us it by post. As a result, we could collect the questionnaire from almost all subjects. These questionnaires were anonymized and converted into numerical values by the outside specialty company.

(3) Collection of clinical information, including the results of colonoscopy and medical imaging, and medical records

All of the enrolled subjects underwent colonoscopy. Therefore, the subjects also took a blood test, medical imaging and so on. Shinichi Yachida et al collected such clinical information and checked medical records in approximately 350 subjects who were newly enrolled. In addition, we updated the clinical information for the enrolled subjects when they returned visit to the hospital.

(4) Metagenome and metabolome analyses

We aggressively asked the subjects, who were considered to be healthy, to participate in the project because the reference data in healthy subjects by metagenome and metabolome analyses are needed to compare with those in the patients with the disease. We performed DNA extraction of 123 subjects for metagenome analysis based on the most up-to-date protocol (magnetic beads-based method) of MetaHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract).

(5) Establishment of the comprehensive database center

Takuji Yamada and Sayaka Mizutani in the Tokyo Institute of Technology data expanded their server and established the data center with Shinichi Yachida. Takuji Yamada is the administrator of this data center and started to enter 1. questionnaire on life style, 2. findings of colonoscopy, 3. medical records, 4. other clinical information, including medical imaging. Takuji Yamada also entered the data of metagenome and metabolome analyses and prepared the environment for comprehensive multi-omics analyses.

(6) Standardization of the sampling and analytical methods of microbiota

We are using the MetaHIT protocol for DNA extraction and sequencing. Therefore, we can compare our data to the European data obtained using the MetaHIT protocol, but can't compare to the American data obtained using the HMP (Human Microbiome Project) protocol. Shinichi Yachida and Takuji Yamada have been discussed the standardization of these protocols for metagenome analysis with Dr Sasagawa and Dr Ohno, who are program supervisor and program officer respectively in AMED-CREST, advisors in AMED-CREST, the company consortium and experts in this field once a month.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 0 件）

1. Kim YG, Sakamoto K, Seo SU, Pickard JM, Gilliland MG 3rd, Pudlo NA, Hoostal M, Li X, Wang TD, Feehley T, Stefká AT, Schmidt TM, Martens EC, Fukuda S, Inohara N, Nagler CR, Núñez G. Neonatal acquisition of Clostridia species protects against colonization by bacterial pathogens. *Science*. 2017, 56: 315-319.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 特になし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 「ヒト腸内環境大規模研究の現場から」、谷内田真一、JCHM (Japanese Consortium for Human Microbiome) ワークショップ、2017/3/23、国内.

(4) 特許出願

- 特になし