

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6914552号
(P6914552)

(45) 発行日 令和3年8月4日(2021.8.4)

(24) 登録日 令和3年7月16日(2021.7.16)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 Q	1/686	(2018.01)	C 1 2 Q	1/686 Z N A Z
C 1 2 Q	1/689	(2018.01)	C 1 2 Q	1/689 Z
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09 Z

請求項の数 4 (全 58 頁)

(21) 出願番号	特願2019-535378 (P2019-535378)	(73) 特許権者	516348577
(86) (22) 出願日	平成29年12月27日 (2017.12.27)		エムディーヘルスケアインコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2020-503864 (P2020-503864A)		MD HEALTHCARE INC.
(43) 公表日	令和2年2月6日 (2020.2.6)		大韓民国 ソウル 03923、マポーグ、ワールドカップブクロー56-ギル、9、#1303、(サンアムードン、ウリィテクノロジービルディング)
(86) 国際出願番号	PCT/KR2017/015557	(74) 代理人	110000729
(87) 国際公開番号	W02018/124735		特許業務法人 ユニアス国際特許事務所
(87) 国際公開日	平成30年7月5日 (2018.7.5)	(72) 発明者	キム、ユンクン
審査請求日	令和1年8月23日 (2019.8.23)		大韓民国 10908 キョンギード、パチュエシ、ハンビットロー、70、521-203
(31) 優先権主張番号	10-2016-0181574		
(32) 優先日	平成28年12月28日 (2016.12.28)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		
(31) 優先権主張番号	10-2017-0180144		
(32) 優先日	平成29年12月26日 (2017.12.26)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細菌メタゲノム分析を通じた大腸腫瘍の判定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の段階を含む、大腸腫瘍判定のための情報提供方法：

- (a) 被検体サンプルから分離した細胞外小胞からDNAを抽出する段階；
- (b) 前記抽出したDNAに対して配列番号1および配列番号2のプライマーペアを利用してPCRを行う段階；および
- (c) 前記PCR産物の配列分析を通して正常ヒトと被検体サンプルで細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較して、

1) 正常ヒト由来サンプルに比べて被検体の糞便サンプルから分離したアグロバクテリウム (Agrobacterium) およびロセアテレス (Roseateles) 属 (genus) 細菌由来小胞の含量が増加しており、フィーカリバクテリウム (Faecalibacterium) およびハロモナス (Halomonas) 属 (genus) 細菌由来小胞の含量が減少している場合、大腸癌と判定する段階；または

2) 正常ヒト由来サンプルに比べて被検体の尿サンプルから分離したアロイオコッカス (Alloiococcus) およびシトロバクター (Citrobacter) 属 (genus) 細菌由来小胞の含量が増加しており、アシネトバクター (Acinetobacter) およびエンテロコッカス (Enterococcus) 属 (genus) 細菌由来小胞の含量が減少している場合、大腸癌と判定する段階；または

3) 正常ヒト由来サンプルに比べて被検体の尿サンプルから分離したバクテロイデス (Bacteroides) およびシトロバクター (Citrobacter) 属 (gen

us)細菌由来小胞の含量が増加しており、アシネトバクター(Acinetobacter)およびエグジゴバクテリウム(Exiguobacterium)属(genus)細菌由来小胞の含量が減少している場合、大腸ポリープと判定する段階を含むことを特徴とする、メタゲノム分析を通して、大腸腫瘍判定のための情報提供方法。

【請求項2】

前記(c)の1)段階で、

正常ヒト由来サンプルに比べて被検体の糞便サンプルから分離したアグロバクテリウム(Agrobacterium)およびロセアテレス(Roseateles)属(genus)細菌由来小胞の含量が増加しており、フィーカリバクテリウム(Faecalibacterium)およびハロモナス(Halomonas)属(genus)細菌由来小胞の含量が減少しており；

10

放線菌門(Actinobacteria)、アキドバクテリウム門(Acidobacteria)、アルマティモナス門(Armatimonadetes)、プランクトミケス門(Planctomycetes)、およびフソバクテリア(Fusobacteria)よりなる群から選ばれる1種以上の門(ylum)細菌由来細胞外小胞、バシラス綱(Bacilli)、アルファプロテオバクテリア(Alphaproteobacteria)、サブロスピレ(Saprospirae)、フィンブレイモナジア(Fimbriimonadia)、アキドバクテリア-6(Acidobacteria-6)、ソリバクテレス(Solibacteres)、コリオバクテリア(Coriobacteriia)、オシラトリオピシジエ(Oscillatoriophyceidae)、およびフソバクテリア(Fusobacteriia)よりなる群から選ばれる1種以上の綱(class)細菌由来細胞外小胞、

20

リゾビウム目(Rhizobiales)、乳酸菌目(Lactobacillales)、ロドバクテラレス(Rhodobacterales)、サブロスピラレス(Saprospirales)、スフィンゴモナダレス(Sphingomonadales)、フィンブレイモナダレス(Fimbriimonadales)、ソリバクテラレス(Solibacterales)、コリオバクテリウム目(Coriobacteriales)、クロオコックス目(Chroococcales)、フソバクテリウム菌目(Fusobacteriales)、およびブデロビブリオナレス(Bdellovibrionales)よりなる群から選ばれる1種以上の目(order)細菌由来細胞外小胞、

30

ロドバクテラシエ(Rhodobacteraceae)、ノカルディオイダシエ(Nocardioideaceae)、スフィンゴモナダシエ(Sphingomonadaceae)、バルトネラセエ(Bartonellaceae)、セルロモナダシエ(Cellulomonadaceae)、乳酸菌科(Lactobacillaceae)、リゾビウム科(Rhizobiaceae)、フィンブレイモナダシエ(Fimbriimonadaceae)、デルマコッカシエ(Dermacoccaceae)、レプトトリキアシエ(Leptotrichiaceae)、コリオバクテリウム科(Coriobacteriaceae)、キセノコッカシエ(Xenococcaceae)、アエロモナダシエ(Aeromonadaceae)、ゲオデルマトフィラシエ(Geodermatophilaceae)、およびブデロビブリオナシエ(Bdellovibrionaceae)よりなる群から選ばれる1種以上の科(family)細菌由来細胞外小胞、または

40

カプノサイトファーガ(Capnocytophaga)、スフィンゴモナス(Sphingomonas)、乳酸菌属(Lactobacillus)、フィンブレイモナス(Fimbriimonas)、デルマコッカス(Dermacoccus)、アクロモバクター(Achromobacter)、ノボスフィンゴビウム(Novosphingobium)、スニーシア(Sneathia)、ブラストモナス(Blastomonas)、ブデロビブリオ(Bdellovibrion)、アルカニンディゲス(Alkanindiges)、およびシャットルワシア(Shuttleworthia)より

50

なる群から選ばれる1種以上の属 (genus) 細菌由来細胞外小胞の含量が増加している場合；または

デフェリバクター門 (Deferribacteres)、およびテネリクテス (Tenericutes) よりなる群から選ばれる1種以上の門 (phylum) 細菌由来細胞外小胞、

デフェリバクター綱 (Deferribacteres)、およびモリクテス綱 (Mollicutes) よりなる群から選ばれる1種以上の綱 (class) 細菌由来細胞外小胞、

デフェリバクター目 (Deferribacterales)、ツリシバクテラレス (Turicibacterales)、およびオケアノスピリラレス (Oceanospirillales) よりなる群から選ばれる1種以上の目 (order) 細菌由来細胞外小胞、

ペプトコッカシエ (Peptococcaceae)、デフェリバクター科 (Deferribacteraceae)、ツリシバクテラシエ (Turicibacteraceae)、ハロモナダシエ (Halomonadaceae)、クロストリジウム科 (Clostridiaceae)、プレボテラ科 (Prevotellaceae)、およびペプトストレプトコッカシエ (Peptostreptococcaceae) よりなる群から選ばれる1種以上の科 (family) 細菌由来細胞外小胞、または

プロテウス (Proteus)、カテニバクテリウム (Catenibacterium)、ムシスピリルム (Mucispirillum)、ユーバクテリウム (Eubacterium)、ツリシバクター (Turicibacter)、アロイオコッカス (Alloiococcus)、プレボテラ (Prevotella)、ジアリスタ (Dialister)、アナエロステイペス (Anaerostipes)、およびブラウティア (Blautia) よりなる群から選ばれる1種以上の属 (genus) 細菌由来細胞外小胞の含量が減少している場合、大腸癌と判定することを特徴とする、

請求項1に記載のメタゲノム分析を通して大腸腫瘍判定のための情報提供方法。

【請求項3】

前記(c)の2)段階で、

正常ヒト由来サンプルに比べて被検体の尿サンプルから分離したアロイオコッカス (Alloiococcus) およびシトロバクター (Citrobacter) 属 (genus) 細菌由来小胞の含量が増加しており、アシネトバクター (Acinetobacter) およびエンテロコッカス (Enterococcus) 属 (genus) 細菌由来小胞の含量が減少しており；

ユーリ古細菌 (Euryarchaeota) 門 (phylum) 細菌由来細胞外小胞、

クロストリジア (Clostridia)、およびメタノバクテリア (Methanobacteria) よりなる群から選ばれる1種以上の綱 (class) 細菌由来細胞外小胞、

クロストリジアルス (Clostridiales)、ツリシバクテラレス (Turicibacterales)、デスルフォビブリオナレス (Desulfovibrionales)、オケアノスピリラレス (Oceanospirillales)、およびメタノバクテリアレス (Methanobacteriales) よりなる群から選ばれる1種以上の目 (order) 細菌由来細胞外小胞、

ストレプトコッカシエ (Streptococcaceae)、ツリシバクテラシエ (Turicibacteraceae)、ベイロネラシエ (Veillonellaceae)、バクテロイダシエ (Bacteroidaceae)、アエロコッカシエ (Aerococcaceae)、コマモナダシエ (Comamonadaceae)、クロストリジウム科 (Clostridiaceae)、パラプレボテラシエ (Paraprevotellaceae)、クリステンセネラセエ (Christensenellaceae)、ルミノコッカシエ (Ruminococcaceae)、コリネバクテリアシ

10

20

30

40

50

エ(Corynebacteriaceae)、ゴルドニアシエ(Gordoniaceae)、マイコバクテリアシエ(Mycobacteriaceae)、デスルフォビブリオナシエ(Desulfovibrionaceae)、ハロモナダシエ(Halomonadaceae)、アルカリゲナシエ(Alcaligenaceae)、バルネシエラシエ(Barnesiellaceae)、メタノバクテリアシエ(Methanobacteriaceae)、およびリケネラシエ(Rikenellaceae)よりなる群から選ばれる1種以上の科(family)細菌由来細胞外小胞、または

ツリシバクター(Turicibacter)、コプロコッカス(Coprococcus)、バクテロイデス(Bacteroides)、ドレア(Dorea)、ストレプトコッカス(Streptococcus)、ラクノスピラ(Lachnospira)、ルミノコッカス(Ruminococcus)、コリネバクテリウム(Corynebacterium)、コマモナス(Comamonas)、コルドニア(Gordonia)、パラプレボテラ(Paraprevotella)、マイコバクテリウム(Mycobacterium)、ロゼブリア(Roseburia)、ジアリスタ(Dialister)、スラッキア(Slackia)、大腸菌属(Escherichia)、ファスコラルクトバクテリウム(Phascolarctobacterium)、ステレラ(Sutterella)、ビルジバチルス(Virgibacillus)、エガセラ(Eggerthella)、ハロモナス(Halomonas)、ロゼオモナス(Roseomonas)、セラチア(Serratia)、メタノブレビバクター(Methanobrevibacter)、およびビロフィラ(Bilophila)よりなる群から選ばれる1種以上の属(genus)細菌由来細胞外小胞の含量が増加している場合；または

プロテオバクテリア(Proteobacteria)門(phylum)細菌由来細胞外小胞、

ガンマプロテオバクテリア(Gammaproteobacteria)綱(class)細菌由来細胞外小胞、

デスルフォバクテラレス(Desulfobacterales)、ストラメノピレス(Stramenopiles)、およびシュードモナダレス(Pseudomonadales)よりなる群から選ばれる1種以上の目(order)細菌由来細胞外小胞、

モラクセラシエ(Moraxellaceae)、およびシュードモナダシエ(Pseudomonadaceae)よりなる群から選ばれる1種以上の科(family)細菌由来細胞外小胞、または

リゾビウム(Rhizobium)、プロテウス(Proteus)、モルガネラ(Morganelle)、シュードモナス(Pseudomonas)、ラクトコッカス(Lactococcus)よりなる群から選ばれる1種以上の属(genus)細菌由来細胞外小胞の含量が減少している場合、

大腸癌と判定することを特徴とする、請求項2に記載のメタゲノム分析を通して大腸腫瘍判定のための情報提供方法。

【請求項4】

前記(c)の3)段階で、

正常ヒト由来サンプルに比べて被検体の尿サンプルから分離したバクテロイデス(Bacteroides)およびシトロバクター(Citrobacter)属(genus)細菌由来小胞の含量が増加しており、

アシネトバクター(Acinetobacter)およびエグジゴバクテリウム(Exiguobacterium)属(genus)細菌由来小胞の含量が減少しており；

ユーリ古細菌(Euryarchaeota)門(phylum)細菌由来細胞外小胞、

クロストリジア(Clostridia)、およびメタノバクテリア(Methanobacteria)よりなる群から選ばれる1種以上の綱(class)細菌由来細胞外小胞、

10

20

30

40

50

クロストリジiales)、オケアノスピリラles)、デスルフォビブリオナles)、およびメタノバクテリアles)よりなる群から選ばれる1種以上の目(order)細菌由来細胞外小胞、

ストレプトコッカシエ(Streptococcaceae)、ペプトストレプトコッカシエ(Peptostreptococcaceae)、コマモナダシエ(Comamonadaceae)、ベイロネラシエ(Veillonellaceae)、バクテロイダシエ(Bacteroidaceae)、パラプレボテラシエ(Paraprevotellaceae)、ルミノコッカシエ(Ruminococcaceae)、コリネバクテリアシエ(Corynebacteriaceae)、クリステンセネラセエ(Christensenellaceae)、オドリバクテラシエ(Odoribacteraceae)、デスルフォビブリオナシエ(Desulfovibrionaceae)、ハ口モナダシエ(Halomonadaceae)、アルカリゲナシエ(Alcaligenaceae)、バルネシエラシエ(Barnesiellaceae)、メタノバクテリアシエ(Methanobacteriaceae)、およびリケネラシエ(Rikenellaceae)よりなる群から選ばれる1種以上の科(family)細菌由来細胞外小胞、または

10

コプロコッカス(Coprococcus)、ストレプトコッカス(Streptococcus)、ルミノコッカス(Ruminococcus)、コリネバクテリウム(Corynebacterium)、オドリバクテラ(Odoribacter)、クロストリジウム(Clostridium)、コマモナス(Comamonas)、パラプレボテラ(Paraprevotella)、ロゼブリア(Roseburia)、クレブシエラ(Klebsiella)、ビルジバチルス(Virgibacillus)、スラッキア(Slackia)、ジアリスタ(Dialister)、ファスコラルクトバクテリウム(Phascolarctobacterium)、ステレラ(Sutterella)、ハ口モナス(Halomonas)、ロゼオモナス(Roseomonas)、およびメタノブレビバクテラ(Methanobrevibacter)よりなる群から選ばれる1種以上の属(genus)細菌由来細胞外小胞の含量が増加している場合；または

20

プロテオバクテリア(Proteobacteria)門(phylum)細菌由来細胞外小胞、

30

ガンマプロテオバクテリア(Gammaproteobacteria)綱(class)細菌由来細胞外小胞、

ストラメノピレス(Stramenopiles)、およびシュードモナダles)よりなる群から選ばれる1種以上の目(order)細菌由来細胞外小胞、

エクシグオバクテラシエ(Exiguobacteraceae)、モラクセラシエ(Moraxellaceae)、シュードモナダシエ(Pseudomonadaceae)、およびリゾビアセエ(Rhizobiaceae)よりなる群から選ばれる1種以上の科(family)細菌由来細胞外小胞、または

40

リゾビウム(Rhizobium)、モルガネラ(Morganella)、プロテウス(Proteus)、シュードモナス(Pseudomonas)、およびラクトコッカス(Lactococcus)よりなる群から選ばれる1種以上の属(genus)細菌由来細胞外小胞の含量が減少している場合、

大腸ポリープと判定することを特徴とする、請求項1に記載のメタゲノム分析を通して大腸腫瘍判定のための情報提供方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細菌メタゲノム分析を通して大腸腫瘍を診断する方法に関し、より具体的に

50

は、被検体由来サンプルを利用して細菌メタゲノム分析を行って、特定細菌由来細胞外小胞の含量増減を分析することによって、大腸ポリープおよび大腸癌などの大腸腫瘍を診断する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

大腸癌 (colon cancer) あるいは大腸直腸腫瘍 (colorectal cancer) は、盲腸、結腸と直腸にできる悪性腫瘍であって、大腸の最内側の表面である粘膜で発生した癌である。2006年の発表によれば、韓国では、胃癌に次いで2番目に多い癌であって、近年、食生活の様相が西欧化されるに伴い、その発生頻度が急増加しており、最近10年間大腸癌による死亡率は、約80%程度増加して、その上昇速度がずっと高まっている傾向にある。好発年齢は、60代に最も頻繁に発生し、部位別に見れば、直腸に発生する場合は、結腸に発生する場合より若干さらに多い。すべての年齢で大腸癌が発生し得るが、大腸癌患者の90%以上の場合、年齢が40才以上であり、毎10年ごとにその発生率が2倍ずつ増加する。

10

【0003】

すべての大腸癌は、大腸ポリープ (colon polyp) あるいは大腸腺腫 (colon adenoma) から始まると知られており、ポリープは、初めに大腸内壁で上皮が異常な成長をして突出することを言い、成人の15~20%に現れる非常にありふれている病気である。大腸ポリープの以外にも、家族の中で大腸癌にかかったヒトがいる場合、長期間潰瘍性大腸炎に苦しめられた場合にも、大腸癌の危険が増加する。また、大腸癌は、食べ物と関連していると知られている代表的な癌であって、食生活の西欧化に伴って繊維素の摂取が少かったり、動物性脂肪の摂取が多かったり、あるいは精製された糖分 (砂糖) の過剰摂取などが誘発要素と知られている。

20

【0004】

初期大腸癌の場合には、特別な症状が現れないが、症状がない場合にも、目につかない腸出血により血液が失われて、貧血が生じることがあり、時々食欲不振と体重減少が現れることがある。癌が進行された場合には、腹が痛かったり、下痢または便秘ができるなど排便習慣の変化が現れたり、肛門から血が出る直腸出血の症状が現れることがあり、血液は、明るい鮮紅色を示したり、黒い色を示すことがある。大腸癌が進行された場合には、腹で平素には触られなかった塊りが触られることがある。最も注意すべき症状としては、排便習慣の変化、血便、疼痛および貧血であり、特に40才以上の成人においてこのような変化があるときには、徹底的に調査する必要がある。

30

【0005】

大腸癌の診断は、大腸内視鏡検査を通した組織検査を通して癌細胞を発見する場合に可能である。大概に大腸癌は、早期には症状がないので、診断が非常に難しく、現在非侵襲的な方法で大腸癌を予測する方法はない。既存の診断方法としては、大腸癌などの固形癌が進行された場合に発見される場合が多いので、大腸癌による医療費用と死亡を予防するためには、大腸腫瘍の発生および原因因子をあらかじめ予測して、高危険群において大腸癌の発生を予防する方法を提供することが効率的な方法である。

【0006】

一方、人体に共生する微生物は、100兆に達してヒト細胞より10倍多く、微生物の遺伝子数は、ヒトの遺伝子数の100倍を超えると知られている。微生物叢 (microbiota あるいは microbiome) は、与えられた居住地に存在する細菌 (bacteria)、古細菌 (archaea)、真核生物 (eukarya) を含む微生物群集 (microbial community) を言い、腸内微生物叢は、ヒトの生理現象に重要な役割をし、人体細胞と相互作用を通じてヒトの健康と病気に大きい影響を及ぼすものと知られている。人体に共生する細菌は、他の細胞への遺伝子、タンパク質などの情報を交換するためにナノメートルサイズの小胞 (vesicle) を分泌する。粘膜は、200ナノメートル (nm) サイズ以上の粒子は通過できない物理的な防御膜を形成して、粘膜に共生する細菌である場合には粘膜を通過しないが、細菌由来小胞は、サイズ

40

50

が大概 100 ナノメートルサイズ以下であるので、比較的自由に粘膜を通過して人体に吸収される。

【0007】

環境ゲノミクスとも呼ばれるメタゲノム学は、環境で採取したサンプルから得られたメタゲノム資料に対する分析学と言える（韓国特許公開第2011-0073049号）。最近、16sリボソームRNA（16s rRNA）塩基配列を基盤とした方法でヒトの微生物叢の細菌構成をリスト化することが可能になり、16sリボソームRNAの遺伝子である16s rDNA塩基配列を次世代塩基配列分析（next generation sequencing、NGS）platformを利用して分析する。しかし、大腸腫瘍の発病において、糞便のような人体由来物から細菌および細菌由来小胞を分離して、細菌由来小胞に存在するメタゲノム分析を通して大腸ポリープおよび大腸癌などの大腸腫瘍の原因因子を同定して、大腸腫瘍を診断する方法については報告されたことがない。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明者らは、大腸ポリープおよび大腸癌などの大腸腫瘍を診断するために、被検体由来サンプルである尿および糞便を利用して細菌由来小胞から遺伝子を抽出し、これに対してメタゲノム分析を行い、その結果、大腸ポリープおよび大腸癌などの大腸腫瘍の原因因子として作用できる細菌由来細胞外小胞を同定したところ、これに基づいて本発明を完成した。

20

【0009】

これより、本発明は、細菌由来細胞外小胞に存在する遺伝子に対するメタゲノム分析を通して大腸腫瘍を診断するための情報提供方法を提供することを目的とする。

【0010】

しかし、本発明が達成しようとする技術的課題は、以上で言及した課題に制限されず、言及されていないさらに他の課題は、下記の記載から当業者に明確に理解され得る。

【課題を解決するための手段】

【0011】

上記のような本発明の目的を達成するために、本発明は、下記の段階を含む、大腸腫瘍診断のための情報提供方法を提供する：

30

（a）被検体サンプルから分離した細胞外小胞からDNAを抽出する段階；

（b）前記抽出したDNAに対して配列番号1および配列番号2のプライマーペアを利用してPCRを行う段階；および

（c）前記PCR産物の配列分析を通して正常ヒトと大腸癌患者由来サンプルで細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較する段階；または

前記PCR産物の配列分析を通して大腸ポリープ患者と大腸癌患者由来サンプルで細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較する段階；または

前記PCR産物の配列分析を通して正常ヒトと大腸ポリープ患者由来サンプルで細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較する段階。

40

【0012】

そして、本発明は、下記の段階を含む、大腸腫瘍の診断方法を提供する：

（a）被検体サンプルから分離した細胞外小胞からDNAを抽出する段階；

（b）前記抽出したDNAに対して配列番号1および配列番号2のプライマーペアを利用してPCRを行う段階；および

（c）前記PCR産物の配列分析を通して正常ヒトと大腸癌患者由来サンプルで細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較する段階；または

前記PCR産物の配列分析を通して大腸ポリープ患者と大腸癌患者由来サンプルで細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較する段階；または

前記PCR産物の配列分析を通して正常ヒトと大腸ポリープ患者由来サンプルで細菌由

50

来細胞外小胞の含量増減を比較する段階。

【0013】

また、本発明は、下記の段階を含む、大腸腫瘍の発病危険度の予測方法を提供する：

- (a) 被検体サンプルから分離した細胞外小胞からDNAを抽出する段階；
- (b) 前記抽出したDNAに対して配列番号1および配列番号2のプライマーペアを利用してPCRを行う段階；および
- (c) 前記PCR産物の配列分析を通して正常ヒトと大腸癌患者由来サンプルで細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較する段階；または
前記PCR産物の配列分析を通して大腸ポリープ患者と大腸癌患者由来サンプルで細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較する段階；または
前記PCR産物の配列分析を通して正常ヒトと大腸ポリープ患者由来サンプルで細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較する段階。

10

【0014】

本発明の一具現例において、前記段階(c)で前記PCR産物の配列分析を通して正常ヒトと大腸癌患者由来サンプルで細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較する段階を通じて大腸癌を診断することができる。

【0015】

本発明の一具現例において、前記段階(c)でDeferribacteres、Tenericutes、Actinobacteria、Acidobacteria、Armatimonadetes、Planctomycetes、Fusobacteria、Proteobacteria、およびEuryarchaeotaよりなる群から選ばれる1種以上の門(phylum)細菌由来細胞外小胞、

20

Deferribacteres、Mollicutes、4C0d-2、Bacilli、Alphaproteobacteria、Saprospirae、Fimbriimonadia、Acidobacteria-6、Solibacteres、Coriobacteriia、Oscillatoriohyphycideae、Fusobacteriia、Gammaproteobacteria、Clostridia、およびMethanobacteriaよりなる群から選ばれる1種以上の綱(class)細菌由来細胞外小胞、

RF32、YS2、Deferribacterales、Turicibacterales、RF39、Oceanospirillales、Rhizobiales、Lactobacillales、Rhodobacterales、Saprospirales、Sphingomonadales、Fimbriimonadales、iii1-15、Solibacterales、Coriobacteriales、Chroococcales、Fusobacteriales、Bdellovibrionales、Desulfobacterales、Stramenopiles、Pseudomonadales、Clostridiales、Desulfovibrionales、およびMethanobacterialesよりなる群から選ばれる1種以上の目(order)細菌由来細胞外小胞、

30

Peptococcaceae、Deferribacteraceae、Turicibacteraceae、Halomonadaceae、Clostridiaceae、Prevotellaceae、Peptostreptococcaceae、Rhodobacteraceae、Nocardioideaceae、Sphingomonadaceae、Bartonellaceae、Cellulomonadaceae、Lactobacillaceae、Rhizobiaceae、Fimbriimonadaceae、Dermaococcaceae、Leptotrichiaceae、Coriobacteriaceae、Xenococcaceae、Aeromonadaceae、Geodermatophilaceae、Bdellovibrionaceae、Moraxellaceae、Pseudomonadaceae、Streptococcaceae、Veillonellaceae、Bacter

40

50

oidaceae、Aerococcaceae、Comamonadaceae、Paraprevotellaceae、Christensenellaceae、Ruminococcaceae、Corynebacteriaceae、Gordoniaceae、Mycobacteriaceae、Desulfovibrionaceae、Alcaligenaceae、Barnesiellaceae、Methanobacteriaceae、およびRikenellaceaeよりなる群から選ばれる1種以上の科(family)細菌由来細胞外小胞、または

rc4-4、Proteus、Catenibacterium、Mucispirillum、Eubacterium、Turicibacter、Alloiococcus、Halomonas、Prevotella、Dialister、Anaerostipes、SMB53、Faecalibacterium、Blautia、Capnocytophaga、Sphingomonas、Lactobacillus、Fimbrimonas、Dermacoccus、Achromobacter、Novosphingobium、Sneathia、Agrobacterium、Blastomonas、Bdellovibrio、Alkanindiges、Roseateles、Shuttleworthia、Rhizobium、Morganelle、Acinetobacter、Pseudomonas、Enterococcus、Lactococcus、Coprococcus、Bacteroides、Dorea、Streptococcus、Lachnospira、Ruminococcus、Corynebacterium、Comamonas、Gordonia、Paraprevotella、Mycobacterium、Roseburia、Slackia、Escherichia、Phascolarctobacterium、Sutterella、Virgibacillus、Eggerthella、Citrobacter、Roseomonas、Serratia、Methanobrevibacter、およびBilophilaよりなる群から選ばれる1種以上の属(genus)細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較することができる。

【0016】

本発明の一具現例において、前記段階(c)で、前記PCR産物の配列分析を通して大腸ポリープ患者と大腸癌患者由来サンプルで細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較する段階を通じて大腸癌を診断することができる。

【0017】

本発明の一具現例において、前記段階(c)でSpirochaetes門(phylum)細菌由来細胞外小胞、

Spirochaetes、およびAcidobacteria-6よりなる群から選ばれる1種以上の綱(class)細菌由来細胞外小胞、

Spirochaetales、およびMyxococcalesよりなる群から選ばれる1種以上の目(order)細菌由来細胞外小胞、

Spirochaetaceae、およびS24-7よりなる群から選ばれる1種以上の科(family)細菌由来細胞外小胞、または

Treponema、Dialister、Oscillospira、およびEubacteriumよりなる群から選ばれる1種以上の属(genus)細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較することができる。

【0018】

本発明の一具現例において、前記段階(c)で、前記PCR産物の配列分析を通して正常ヒトと大腸ポリープ患者由来サンプルで細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較する段階を通じて大腸ポリープを診断することができる。

【0019】

本発明の一具現例において、前記段階(c)でActinobacteria、Proteobacteria、およびEuryarchaeotaよりなる群から選ばれる1種以上の門(phylum)細菌由来細胞外小胞、

10

20

30

40

50

Betaproteobacteria、Solibacteres、Gammaproteobacteria、Clostridia、Methanobacteria、および4C0d-2よりなる群から選ばれる1種以上の綱(class)細菌由来細胞外小胞、

Burkholderiales、Sphingomonadales、Solibacterales、Stramenopiles、Pseudomonadales、Clostridiales、Oceanospirillales、Desulfovibrionales、およびMethanobacterialesよりなる群から選ばれる1種以上の目(order)細菌由来細胞外小胞、

Rhizobiaceae、Sphingomonadaceae、Exiguobacteraceae、Moraxellaceae、Pseudomonadaceae、Streptococcaceae、Peptostreptococcaceae、Comamonadaceae、Veillonellaceae、Bacteroidaceae、Paraprevotellaceae、Ruminococcaceae、Corynebacteriaceae、Christensenellaceae、Odoribacteraceae、Desulfovibrionaceae、Halomonadaceae、Alcaligenaceae、Barnesiellaceae、Methanobacteriaceae、およびRikenellaceaeよりなる群から選ばれる1種以上の科(family)細菌由来細胞外小胞、または

Sphingomonas、Alkanindiges、Roseateles、Rhizobium、Morganelle、Proteus、Exiguobacterium、Acinetobacter、Pseudomonas、SMB53、Lactococcus、Coproccoccus、Streptococcus、Bacteroides、Ruminococcus、Corynebacterium、Odoribacter、Clostridium、Comamonas、Paraprevotella、Roseburia、Citrobacter、Klebsiella、Virgibacillus、Slackia、Dialister、Phascolarctobacterium、Sutterella、Halomonas、Roseomonas、およびMethanobrevibacterよりなる群から選ばれる1種以上の属(genus)細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較することができる。

【0020】

本発明の一具現例において、前記被検体サンプルは、糞便または尿であってもよい。

【発明の効果】

【0021】

環境に存在する細菌から分泌される細胞外小胞は、体内に吸収されて、炎症および癌の発生に直接的な影響を及ぼすことができ、大腸ポリープおよび大腸癌は、症状が現れる前に早期診断が難しいため、効率的な治療が難しいのが現状であるから、本発明による人体由来サンプルを利用した細菌または細菌由来細胞外小胞のメタゲノム分析を通して大腸ポリープおよび大腸癌などの大腸腫瘍発病の危険度をあらかじめ予測することによって、大腸腫瘍の危険群を早期に診断および予測して、適切な管理により発病時期を遅らせたり発病を予防することができ、発病後にも早期診断することができるので、大腸腫瘍の発病率を低下させ、治療効果を高めることができる。また、大腸ポリープあるいは大腸癌と診断された患者においてメタゲノム分析を通して原因因子を予測して、原因因子に対する露出を避けることによって、大腸ポリープおよび大腸癌の経過を良くしたり、再発を防止することができる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1-2】図1は、体内で細菌由来細胞外小胞の分布様相を評価するためのものであって、図1aは、マウスに腸内細菌(Bacteria)および細菌由来小胞(EV)を口腔で投与した後、時間別(0、5min、3h、6h、および12h)にこれらの分布様

10

20

30

40

50

相を撮影した写真であり、図1bは、マウスに腸内細菌 (B a c t e r i a) および細菌由来細胞外小胞 (E V) を口腔で投与し、12時間後に尿および多様な臓器 (心臓、肺、肝、腎臓、脾臓、脂肪組織、および筋肉) を摘出して前記細菌および細胞外小胞の分布様相を撮影した写真である。

【図3】図2は、大腸癌患者および正常ヒトの糞便から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、門 (p h y l u m) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図4】図3は、大腸癌患者および正常ヒトの糞便から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、綱 (c l a s s) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

10

【図5】図4は、大腸癌患者および正常ヒトの糞便から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、目 (o r d e r) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図6】図5は、大腸癌患者および正常ヒトの糞便から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、科 (f a m i l y) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図7】図6は、大腸癌患者および正常ヒトの糞便から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、属 (g e n u s) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図8】図7は、大腸癌患者および正常ヒトの尿から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、門 (p h y l u m) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

20

【図9】図8は、大腸癌患者および正常ヒトの尿から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、綱 (c l a s s) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図10】図9は、大腸癌患者および正常ヒトの尿から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、目 (o r d e r) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図11】図10は、大腸癌患者および正常ヒトの尿から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、科 (f a m i l y) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

30

【図12】図11は、大腸癌患者および正常ヒトの尿から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、属 (g e n u s) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図13】図12は、大腸癌患者および大腸ポリープ患者の糞便から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、門 (p h y l u m) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図14】図13は、大腸癌患者および大腸ポリープ患者の糞便から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、綱 (c l a s s) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

40

【図15】図14は、大腸癌患者および大腸ポリープ患者の糞便から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、目 (o r d e r) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図16】図15は、大腸癌患者および大腸ポリープ患者の糞便から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、科 (f a m i l y) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図17】図16は、大腸癌患者および大腸ポリープ患者の糞便から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、属 (g e n u s) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図18】図17は、大腸癌患者および大腸ポリープ患者の尿から細菌由来小胞を分離し

50

た後、メタゲノム分析を行って、目 (o r d e r) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図 19】図 18 は、大腸癌患者および大腸ポリープ患者の尿から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、属 (g e n u s) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図 20】図 19 は、大腸ポリープ患者および正常ヒトの糞便から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、門 (p h y l u m) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図 21】図 20 は、大腸ポリープ患者および正常ヒトの糞便から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、綱 (c l a s s) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図 22】図 21 は、大腸ポリープ患者および正常ヒトの糞便から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、目 (o r d e r) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図 23】図 22 は、大腸ポリープ患者および正常ヒトの糞便から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、科 (f a m i l y) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図 24】図 23 は、大腸ポリープ患者および正常ヒトの糞便から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、属 (g e n u s) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図 25】図 24 は、大腸ポリープ患者および正常ヒトの尿から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、門 (p h y l u m) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図 26】図 25 は、大腸ポリープ患者および正常ヒトの尿から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、綱 (c l a s s) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図 27】図 26 は、大腸ポリープ患者および正常ヒトの尿から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、目 (o r d e r) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図 28】図 27 は、大腸ポリープ患者および正常ヒトの尿から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、科 (f a m i l y) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【図 29】図 28 は、大腸ポリープ患者および正常ヒトの尿から細菌由来小胞を分離した後、メタゲノム分析を行って、属 (g e n u s) レベルで診断的性能が有意な細菌由来小胞 (E V s) の分布を示した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明は、細菌メタゲノム分析を通して大腸ポリープおよび大腸癌などの大腸腫瘍を診断する方法に関し、本発明者らは、被検体由来サンプルを利用して細菌由来細胞外小胞から遺伝子を抽出し、これに対してメタゲノム分析を行い、大腸ポリープおよび大腸癌などの大腸腫瘍の原因因子として作用できる細菌由来細胞外小胞を同定した。

【0024】

これより、本発明は、(a) 被検体サンプルから分離した細胞外小胞から D N A を抽出する段階；

(b) 前記抽出した D N A に対して配列番号 1 および配列番号 2 のプライマーペアを利用して P C R を行う段階；および

(c) 前記 P C R 産物の配列分析を通して正常ヒトと大腸癌患者由来サンプルで細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較する段階；または

前記 P C R 産物の配列分析を通して大腸ポリープ患者と大腸癌患者由来サンプルで細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較する段階；または

10

20

30

40

50

前記PCR産物の配列分析を通して正常ヒトと大腸ポリープ患者由来サンプルで細菌由来細胞外小胞の含量増減を比較する段階を含む大腸腫瘍診断のための情報提供方法を提供する。

【0025】

本発明において使用される用語「大腸癌診断」とは、患者に対して大腸癌が発病する可能性があるか、大腸癌が発病する可能性が相対的に高いか、または大腸癌がすでに発病したかどうかを判別することを意味する。本発明の方法は、任意の特定患者に対する大腸癌の発病危険度が高い患者によって特別かつ適切な管理を通じて発病時期を遅らせたり発病しないようにするのに使用することができる。また、本発明の方法は、大腸癌を早期に診断して、最も適切な治療方式を選択することによって、治療を決定するために臨床的に使用することができる。

10

【0026】

本発明において使用される用語「大腸ポリープ診断」とは、患者に対して大腸ポリープが発病する可能性があるか、大腸ポリープが発病する可能性が相対的に高いか、または大腸ポリープがすでに発病したかどうかを判別することを意味する。本発明の方法は、任意の特定患者に対する大腸ポリープの発病危険度が高い患者によって特別かつ適切な管理を通じて発病時期を遅らせたり発病しないようにするのに使用することができる。また、本発明の方法は、大腸ポリープを早期に診断して最も適切な治療方式を選択することによって、治療を決定するために臨床的に使用することができる。

20

【0027】

本発明において使用される用語「メタゲノム (metagenome)」とは、「群遺伝体」とも言い、土、動物の腸など孤立した地域内のすべてのウイルス、細菌、かびなどを含む遺伝体の総和を意味するものであって、主に培養にならない微生物を分析するために、配列分析器を使用して一度に多くの微生物を同定することを説明する遺伝体の概念に使用される。特に、メタゲノムは、一種のゲノムまたは遺伝体を言うものではなく、一つの環境単位のすべての種の遺伝体であって、一種の混合遺伝体を言う。これは、オミックス的に生物学が発展する過程で一種を定義するとき、機能的に既存の一種だけでなく、多様な種が互いに相互作用して完全な種を作るという観点から出た用語である。技術的には、速い配列分析法を利用して、種に関係なく、すべてのDNA、RNAを分析して、一つの環境内でのすべての種を同定し、相互作用、代謝作用を糾明する技法の対象である。本発明では、好ましくは血清から分離した細菌由来細胞外小胞を利用してメタゲノム分析を実施した。

30

【0028】

本発明の実施例では、正常ヒト、大腸ポリープ患者、および大腸癌患者の糞便および尿内細菌由来細胞外小胞に存在する遺伝子に対するメタゲノム分析を実施し、門 (phylum)、綱 (class)、目 (order)、科 (family)、および属 (genus) レベルでそれぞれ分析して、実際に大腸癌および大腸ポリープの発生原因として作用できる細菌由来小胞を同定した。

【0029】

より具体的に、本発明の一実施例では、糞便に存在する細菌由来小胞メタゲノムを門レベルで分析した結果、Deferribacteres、Tenericutes、Actinobacteria、Acidobacteria、Armatimonadetes、Planctomycetes、およびFusobacteria門細菌由来小胞が大腸癌患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例4参照)。

40

【0030】

より具体的に、本発明の一実施例では、糞便に存在する細菌由来小胞メタゲノムを綱レベルで分析した結果、Deferribacteres、Mollucutes、4C0d-2、Bacilli、Alphaproteobacteria、Saprospirae、Fimbriimonadia、Acidobacteria-6、Solibacteres、Coriobacteria、Oscillatorioophyci

50

deae、およびFusobacteriia綱細菌由来小胞が大腸癌患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例4参照)。

【0031】

より具体的に、本発明の一実施例では、糞便に存在する細菌由来小胞メタゲノムを目レベルで分析した結果、RF32、YS2、Deferribacterales、Turicibacterales、RF39、Oceanospirillales、Rhizobiales、Lactobacillales、Rhodobacterales、Saprospirales、Sphingomonadales、Fimbriimonadales、iii1-15、Solibacterales、Coriobacteriales、Chroococcales、Fusobacteriales、およびBdellovibrionales目細菌由来小胞が大腸癌患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例4参照)。

10

【0032】

より具体的に、本発明の一実施例では、糞便に存在する細菌由来小胞メタゲノムを科レベルで分析した結果、Peptococcaceae、Deferribacteraceae、Turicibacteraceae、Halomonadaceae、Clostridiaceae、Prevotellaceae、Peptostreptococcaceae、Rhodobacteraceae、Nocardioideaceae、Sphingomonadaceae、Bartonellaceae、Cellulomonadaceae、Lactobacillaceae、Rhizobiaceae、Fimbriimonadaceae、Dermacoccaceae、Leptotrichiaceae、Coriobacteriaceae、Xenococcaceae、Aeromonadaceae、Geodermatophilaceae、およびBdellovibrionaceae科細菌由来小胞が大腸癌患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例4参照)。

20

【0033】

より具体的に、本発明の一実施例では、糞便に存在する細菌由来小胞メタゲノムを属レベルで分析した結果、rc4-4、Proteus、Catenibacterium、Mucispirillum、Eubacterium、Turicibacter、Alloiooccus、Halomonas、Prevotella、Dialister、Anaerostipes、SMB53、Faecalibacterium、Blautia、Capnocytophaga、Sphingomonas、Lactobacillus、Fimbriimonas、Dermacoccus、Achromobacter、Novosphingobium、Sneathia、Agrobacterium、Blastomonas、Bdellovibrio、Alkanindiges、Roseateles、およびShuttleworthia属細菌由来小胞が大腸癌患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例4参照)。

30

【0034】

より具体的に、本発明の一実施例では、尿に存在する細菌由来小胞メタゲノムを門レベルで分析した結果、Proteobacteria、およびEuryarchaeota門細菌由来小胞が大腸癌患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例5参照)。

40

【0035】

より具体的に、本発明の一実施例では、尿に存在する細菌由来小胞メタゲノムを綱レベルで分析した結果、Gammaproteobacteria、Clostridia、およびMethanobacteria綱細菌由来小胞が大腸癌患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例5参照)。

【0036】

より具体的に、本発明の一実施例では、尿に存在する細菌由来小胞メタゲノムを目レベルで分析した結果、Desulfobacterales、Stramenopiles、Pseudomonadales、Clostridiales、Turicibac

50

terales、Desulfovibrionales、Oceanospirillales、およびMethanobacteriales目細菌由来小胞が大腸癌患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例5参照)。

【0037】

より具体的に、本発明の一実施例では、尿に存在する細菌由来小胞メタゲノムを科レベルで分析した結果、Moraxellaceae、Pseudomonadaceae、Streptococcaceae、Turicibacteraceae、Veillonellaceae、Bacteroidaceae、Aerococcaceae、Comamonadaceae、Clostridiaceae、Paraprevotellaceae、Christensenellaceae、Ruminococcaceae、Corynebacteriaceae、Gordoniaceae、Mycobacteriaceae、Desulfovibrionaceae、Halomonadaceae、Alcaligenaceae、Barnesiellaceae、Methanobacteriaceae、およびRikenellaceae科細菌由来小胞が大腸癌患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例5参照)。

10

【0038】

より具体的に、本発明の一実施例では、尿に存在する細菌由来小胞メタゲノムを属レベルで分析した結果、Rhizobium、Proteus、Morganella、Acinetobacter、Pseudomonas、SMB53、Enterococcus、Lactococcus、Turicibacter、Coprococcus、Bacteroides、Dorea、Streptococcus、Lachnospira、Ruminococcus、Corynebacterium、Comamonas、Gordonia、Paraprevotella、Mycobacterium、Roseburia、Dialister、Slackia、Escherichia、Phascolarctobacterium、Sutterella、Virgibacillus、Eggerthella、Halomonas、Citrobacter、Roseomonas、Alloiococcus、Serratia、Methanobrevibacter、およびBilophila属細菌由来小胞が大腸癌患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例5参照)。

20

【0039】

より具体的に、本発明の一実施例では、糞便に存在する細菌由来小胞メタゲノムを門レベルで分析した結果、Spirochaetes門細菌由来小胞が大腸癌患者と大腸ポリープ患者との間に有意な差異があった(実施例6参照)。

30

【0040】

より具体的に、本発明の一実施例では、糞便に存在する細菌由来小胞メタゲノムを綱レベルで分析した結果、Spirochaetes、およびAcidobacteria-6綱細菌由来小胞が大腸癌患者と大腸ポリープ患者との間に有意な差異があった(実施例6参照)。

【0041】

より具体的に、本発明の一実施例では、糞便に存在する細菌由来小胞メタゲノムを目レベルで分析した結果、Spirochaetales目細菌由来小胞が大腸癌患者と大腸ポリープ患者との間に有意な差異があった(実施例6参照)。

40

【0042】

より具体的に、本発明の一実施例では、糞便に存在する細菌由来小胞メタゲノムを科レベルで分析した結果、Spirochaetaceae、およびS24-7科細菌由来小胞が大腸癌患者と大腸ポリープ患者との間に有意な差異があった(実施例6参照)。

【0043】

より具体的に、本発明の一実施例では、糞便に存在する細菌由来小胞メタゲノムを属レベルで分析した結果、Treponema、Dialister、およびOscillospira属細菌由来小胞が大腸癌患者と大腸ポリープ患者との間に有意な差異があった

50

(実施例6参照)。

【0044】

より具体的に、本発明の一実施例では、尿に存在する細菌由来小胞メタゲノムを目レベルで分析した結果、Myxococcales目細菌由来小胞が大腸癌患者と大腸ポリープ患者との間に有意な差異があった(実施例7参照)。

【0045】

より具体的に、本発明の一実施例では、尿に存在する細菌由来小胞メタゲノムを属レベルで分析した結果、Eubacterium目細菌由来小胞が大腸癌患者と大腸ポリープ患者との間に有意な差異があった(実施例7参照)。

【0046】

より具体的に、本発明の一実施例では、糞便に存在する細菌由来小胞メタゲノムを門レベルで分析した結果、Actinobacteria門細菌由来小胞が大腸ポリープ患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例8参照)。

【0047】

より具体的に、本発明の一実施例では、糞便に存在する細菌由来小胞メタゲノムを綱レベルで分析した結果、Betaproteobacteria、およびSolibacteres綱細菌由来小胞が大腸ポリープ患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例8参照)。

より具体的に、本発明の一実施例では、糞便に存在する細菌由来小胞メタゲノムを目レベルで分析した結果、Burkholderiales、Sphingomonadales、およびSolibacterales目細菌由来小胞が大腸ポリープ患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例8参照)。

【0048】

より具体的に、本発明の一実施例では、糞便に存在する細菌由来小胞メタゲノムを科レベルで分析した結果、Rhizobiaceae、およびSphingomonadaceae科細菌由来小胞が大腸ポリープ患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例8参照)。

【0049】

より具体的に、本発明の一実施例では、糞便に存在する細菌由来小胞メタゲノムを属レベルで分析した結果、Sphingomonas、Alkanindiges、およびRoseateles属細菌由来小胞が大腸ポリープ患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例8参照)。

【0050】

より具体的に、本発明の一実施例では、尿に存在する細菌由来小胞メタゲノムを門レベルで分析した結果、Proteobacteria、およびEuryarchaeota門細菌由来小胞が大腸ポリープ患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例9参照)。

【0051】

より具体的に、本発明の一実施例では、尿に存在する細菌由来小胞メタゲノムを綱レベルで分析した結果、Gammaproteobacteria、Clostridia、Methanobacteria、および4C0d-2綱細菌由来小胞が大腸ポリープ患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例9参照)。

【0052】

より具体的に、本発明の一実施例では、尿に存在する細菌由来小胞メタゲノムを目レベルで分析した結果、Stramenopiles、Pseudomonadales、Clostridiales、Oceanospirillales、Desulfobibrionales、およびMethanobacteriales目細菌由来小胞が大腸ポリープ患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった(実施例9参照)。

【0053】

より具体的に、本発明の一実施例では、尿に存在する細菌由来小胞メタゲノムを科レベ

10

20

30

40

50

ルで分析した結果、Exiguobacteraceae、Moraxellaceae、Pseudomonadaceae、Rhizobiaceae、Streptococcaceae、Peptostreptococcaceae、Comamonadaceae、Veillonellaceae、Bacteroidaceae、Paraprevotellaceae、Ruminococcaceae、Corynebacteriaceae、Christensenellaceae、Odoribacteraceae、Desulfovibrionaceae、Halomonadaceae、Alcaligenaceae、Barnesiellaceae、Methanobacteriaceae、およびRikenellaceae科細菌由来小胞が大腸ポリープ患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった（実施例9参照）。

10

【0054】

より具体的に、本発明の一実施例では、尿に存在する細菌由来小胞メタゲノムを属レベルで分析した結果、Rhizobium、Morganella、Proteus、Exiguobacterium、Acinetobacter、Pseudomonas、SMB53、Lactococcus、Coprococcus、Streptococcus、Bacteroides、Ruminococcus、Corynebacterium、Odoribacter、Clostridium、Comamonas、Paraprevotella、Roseburia、Citrobacter、Klebsiella、Virgibacillus、Slackia、Dialister、Hascolarctobacterium、Sutterella、Halomonas、Roseomonas、およびMethanobrevibacter属細菌由来小胞が大腸ポリープ患者と正常ヒトとの間に有意な差異があった（実施例9参照）。

20

【0055】

本発明は、上記のような実施例結果を通じて、糞便および尿から分離した細菌由来細胞外小胞に対してメタゲノム分析を実施することによって、正常ヒトおよび大腸ポリープ患者と比較して大腸癌患者において含量が有意に変化した細菌由来小胞を同定し、メタゲノム分析を通して前記各レベルで細菌由来小胞の含量増減を分析することによって、大腸癌を診断することができることを確認した。

【0056】

また、本発明は、上記のような実施例結果を通じて、糞便および尿から分離した細菌由来細胞外小胞に対してメタゲノム分析を実施することによって、正常ヒトと比較して大腸ポリープ患者において含量が有意に変化した細菌由来小胞を同定し、メタゲノム分析を通して前記各レベルで細菌由来小胞の含量増減を分析することによって、大腸ポリープを診断することができることを確認した。

30

【0057】

以下、本発明の理解を助けるために好ましい実施例を提示する。しかし、下記の実施例は、本発明をより容易に理解するために提供されるものに過ぎず、下記実施例によって本発明の内容が限定されるものではない。

【実施例】

【0058】

[実施例]

実施例1. 腸内細菌および細菌由来小胞の体内吸収、分布、および排泄様相の分析

腸内細菌と細菌由来小胞が胃腸管を介して全身的に吸収されるかを評価するために、次のような方法で実験を行った。マウスの胃腸に蛍光で標識した腸内細菌と腸内細菌由来小胞をそれぞれ50 μ gの用量で胃腸管で投与し、0分、5分、3時間、6時間、12時間後に蛍光を測定した。マウス全体イメージを観察した結果、図1aに示したように、前記細菌(Bacteria)の場合には、全身的に吸収されないが、細菌由来小胞(EV)の場合には、投与後に5分に全身的に吸収され、投与3時間後には、膀胱に蛍光が濃く観察されて、小胞が泌尿器系に排泄されることが分かった。また、小胞は、投与12時間まで体内に存在することが分かった。

40

【0059】

腸内細菌と腸内細菌由来小胞が全身的に吸収された後、様々な臓器に浸潤された様相を評価するために、蛍光で標識した50 µgの細菌と細菌由来小胞を前記の方法のように投与した後、12時間目にマウスから血液(Blood)、心臓(Heart)、肺(Lung)、肝(Liver)、腎臓(Kidney)、脾臓(Spleen)、脂肪組織(Adipose tissue)、および筋肉(Muscle)を摘出した。前記摘出した組織で蛍光を観察した結果、図1bに示したように、前記腸内細菌(Bacteria)は、各臓器に吸収されない反面、前記腸内細菌由来細胞外小胞(EV)は、血液、心臓、肺、肝、腎臓、脾臓、脂肪組織、および筋肉に分布することを確認した。

【0060】

実施例2．糞便および尿から小胞分離およびDNA抽出

糞便および尿から小胞を分離し、DNAを抽出するために、まず、10mlチューブに糞便および尿を入れ、遠心分離(3,500×g、10min、4℃)を実施して浮遊物を沈めて上澄み液だけを回収した後、新しい10mlチューブに移した。0.22 µmフィルターを使用して前記回収した上澄み液から細菌および異物を除去した後、セントリフュグチューブ(centrifugal filters 50kD)に移し、1,500×g、4℃で15分間遠心分離して50kDより小さい物質は捨て、10mlまで濃縮させた。再び0.22 µmフィルターを使用してバクテリアおよび異物を除去した後、Type 90tiローターで150,000×g、4℃で3時間の間超高速遠心分離方法を使用して上澄み液を捨て、固まったペレット(pellet)を生理食塩水(PBS)で溶かして小胞を収得した。

【0061】

前記方法によって糞便および尿から分離した小胞100 µlを100℃で沸かして内部のDNAを脂質外に出るようにした後、氷に5分間冷ました。次に、残った浮遊物を除去するために、10,000×g、4℃で30分間遠心分離し、上澄み液だけを集めた後、Nanodropを利用してDNA量を定量した。以後、前記抽出されたDNAに細菌由来DNAが存在するかを確認するために、下記表1に示した16S rDNA primerでPCRを行うことによって、前記抽出された遺伝子に細菌由来遺伝子が存在することを確認した。

【0062】

【表1】

primer		配列	配列番号
16S rDN A	16S_V3_F	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'	1
	16S_V4_R	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'	2

【0063】

実施例3．糞便および尿内小胞から抽出したDNAを利用したメタゲノム分析

前記実施例2の方法で遺伝子を抽出した後、前記表1に示した16S rDNAプライマーを使用してPCRを実施して遺伝子を増幅させ、シーケンシング(Illumina MiSeq sequencer)を行った。結果をStandard Flowgram Format(SFF)ファイルで出力し、GS FLX software(v2.9)を利用してSFFファイルをsequenceファイル(.fasta)とnucleotide quality scoreファイルに変換した後、リードの信用度評価を確認し、window(20bps)平均base call accuracyが99%未満(Phred score<20)である部分を除去した。質が低い部分を

10

20

30

40

50

除去した後、リードの長さが300bps以上であるものだけを利用し(Sickle version 1.33)、結果分析のために、Operational Taxonomy Unit(OTU)は、UCLUSTとUSEARCHを利用してシーケンス類似度によってクラスタリングを行った。具体的に、属(genus)は94%、科(family)は90%、目(order)は85%、綱(class)は80%、門(phylum)は75%シーケンス類似度を基準としてクラスタリングをし、各OTUの門、綱、目、科、属レベルの分類を行い、BLASTNとGreenGenesの16S DNAシーケンスデータベース(108、453シーケンス)を利用して97%以上のシーケンス類似度を有するバクテリアを分析した(QIIME)。

【0064】

10

実施例4．正常ヒトと大腸癌患者の糞便から分離した細菌由来小胞メタゲノム分析基盤大腸癌診断模型

前記実施例3の方法で、大腸癌患者29人と正常ヒト358人の糞便から小胞を分離した後、メタゲノムシーケンシングを行った。診断模型の開発は、まず、t-testで二つの群間のp値が0.05以下であり、二つの群間に2倍以上違いが生じる菌株を選定した後、logistic regression analysis方法で診断的性能指標であるAUC(area under curve)、敏感度、および特異度を算出した。

【0065】

糞便内細菌由来小胞を門(phylum)レベルで分析した結果、Deferribacteres、Tenericutes、Actinobacteria、Acidobacteria、Armatimonadetes、Planctomycetes、およびFusobacteria門細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断模型を開発したとき、大腸癌に対する診断的性能が有意に現れた(表2および図2参照)。

20

【0066】

【表 2】

Taxon	対照群		大腸癌		t-test	Ratio	AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value				
p__Deferribacteres	0.0004	0.0018	0.0001	0.0003	0.0006	0.16	0.74	1.00	0.03
p__Tenericutes	0.0098	0.0256	0.0027	0.0064	0.0001	0.27	0.74	1.00	0.03
p__Actinobacteria	0.0353	0.0403	0.0817	0.0588	0.0003	2.32	0.80	0.99	0.14
p__Acidobacteria	0.0005	0.0024	0.0019	0.0021	0.0024	3.61	0.75	1.00	0.03
p__Armatimonadetes	0.0002	0.0007	0.0009	0.0013	0.0075	5.11	0.77	1.00	0.07
p__Planctomycetes	0.0001	0.0006	0.0011	0.0015	0.0027	7.36	0.82	0.99	0.24
p__Fusobacteriia	0.0016	0.0040	0.0124	0.0202	0.0088	7.60	0.82	0.99	0.17

10

20

【0067】

30

糞便内細菌由来小胞を綱(class)レベルで分析した結果、Deferribacteres、Mollicutes、4C0d-2、Bacilli、Alphaproteobacteria、Saprospirae、Fimbriimonadia、Acidobacteria-6、Solibacteres、Coriobacteriia、Oscillatorioophycideae、およびFusobacteriia綱細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸癌に対する診断的性能が有意に現れた(表3および図3参照)。

【0068】

【表 3】

Taxon	対照群		大腸癌		t-test		AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio			
c__Deferribacteres	0.0004	0.0018	0.0001	0.0003	0.0006	0.16	0.74	1.00	0.03
c__Mollicutes	0.0095	0.0254	0.0026	0.0064	0.0002	0.28	0.74	1.00	0.03
c__4C0d-2	0.0007	0.0028	0.0002	0.0004	0.0084	0.34	0.73	1.00	0.03
c__Bacilli	0.0820	0.0955	0.1661	0.1537	0.0078	2.03	0.75	1.00	0.03
c__Alphaproteobacteria	0.0192	0.0306	0.0491	0.0520	0.0054	2.56	0.80	1.00	0.14
c__[Saprospirae]	0.0003	0.0010	0.0008	0.0012	0.0040	2.94	0.74	1.00	0.03
c__[Fimbriimonadia]	0.0002	0.0007	0.0009	0.0013	0.0075	5.14	0.77	1.00	0.07
c__Acidobacteria-6	0.0001	0.0007	0.0007	0.0010	0.0037	5.85	0.78	0.99	0.03
c__Solibacteres	0.0001	0.0006	0.0006	0.0009	0.0090	5.86	0.75	0.99	0.07
c__Coriobacteriia	0.0040	0.0081	0.0251	0.0363	0.0046	6.33	0.80	0.99	0.17
c__Oscillatoriohyphycideae	0.0001	0.0005	0.0006	0.0009	0.0050	6.72	0.80	0.99	0.10
c__Fusobacteriia	0.0016	0.0040	0.0124	0.0202	0.0088	7.60	0.82	0.99	0.17

【0069】

糞便内細菌由来小胞を目 (order) レベルで分析した結果、RF32、YS2、Deferribacterales、Turicibacterales、RF39、Oceanospirillales、Rhizobiales、Lactobacillales、Rhodobacterales、Saprospirales、Sphingomonadales、Fimbriimonadales、iii1-15、Sol

10

20

30

40

50

ibacteriales、Coriobacteriales、Chroococcales、Fusobacteriales、およびBdellovibrionales目細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸癌に対する診断的性能が有意に現れた(表4および図4参照)。

【0070】

【表 4】

Taxon	对照群		大腸癌		t-test		AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio			
o_RF32	0.0005	0.0026	0.0000	0.0001	0.0005	0.03	0.75	1.00	0.03
o_YS2	0.0006	0.0027	0.0001	0.0002	0.0003	0.09	0.74	1.00	0.03
o_Deferribacterales	0.0004	0.0018	0.0001	0.0003	0.0006	0.16	0.74	1.00	0.03
o_Turicibacterales	0.0148	0.0493	0.0024	0.0053	0.0000	0.16	0.75	1.00	0.03
o_RF39	0.0090	0.0248	0.0017	0.0046	0.0000	0.18	0.75	1.00	0.03
o_Oceanospirillales	0.0009	0.0033	0.0002	0.0003	0.0001	0.22	0.75	1.00	0.03
o_Rhizobiales	0.0085	0.0202	0.0189	0.0215	0.0082	2.23	0.75	1.00	0.03
o_Lactobacillales	0.0519	0.0809	0.1402	0.1495	0.0044	2.70	0.76	1.00	0.10
o_Rhodobacterales	0.0019	0.0057	0.0054	0.0059	0.0020	2.81	0.76	1.00	0.03
o_[Saprospirales]	0.0003	0.0010	0.0008	0.0012	0.0040	2.94	0.74	1.00	0.03
o_Sphingomonadales	0.0050	0.0097	0.0192	0.0207	0.0012	3.87	0.85	0.99	0.21
o_[Fimbriimonadales]	0.0002	0.0007	0.0009	0.0013	0.0075	5.14	0.77	1.00	0.07
o_iii1-15	0.0001	0.0007	0.0006	0.0010	0.0090	5.67	0.78	0.99	0.03
o_Solibacterales	0.0001	0.0006	0.0006	0.0009	0.0089	5.89	0.75	0.99	0.07

10

20

30

40

o__Coriobacteria les	0.0040	0.0081	0.0251	0.0363	0.0046	6.33	0.80	0.99	0.1 7
o__Chroococcal es	0.0001	0.0005	0.0006	0.0009	0.0050	6.63	0.80	0.99	0.1 4
o__Fusobacterial es	0.0016	0.0040	0.0124	0.0202	0.0088	7.60	0.82	0.99	0.1 7
o__Bdellovibrio nales	0.0001	0.0004	0.0006	0.0009	0.0063	9.79	0.76	0.99	0.1 0

10

【 0 0 7 1 】

糞便内細菌由来小胞を科 (family) レベルで分析した結果、Peptococaceae、Deferribacteraceae、Turicibacteraceae、Halomonadaceae、Clostridiaceae、Prevotellaceae、Peptostreptococaceae、Rhodobacteraceae、Nocardioideaceae、Sphingomonadaceae、Bartonellaceae、Cellulomonadaceae、Lactobacillaceae、Rhizobiaceae、Fimbriimonadaceae、Dermacocaceae、Leptotrichiaceae、Coriobacteriaceae、Xenococaceae、Aeromonadaceae、Geodermatophilaceae、およびBdellovibrionaceae科細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸癌に対する診断的性能が有意に現れた(表5および図5参照)。

20

【 0 0 7 2 】

【表 5】

Taxon	对照群		大腸癌		t-test	Ratio	AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value				
f__Peptococcaceae	0.0020	0.0048	0.0001	0.0003	0.0000	0.07	0.80	1.00	0.03
f__Deferribacteraceae	0.0004	0.0018	0.0001	0.0003	0.0006	0.16	0.74	1.00	0.03
f__Turicibacteraceae	0.0148	0.0493	0.0024	0.0053	0.0000	0.16	0.75	1.00	0.03
f__Halomonadaceae	0.0008	0.0027	0.0002	0.0003	0.0002	0.25	0.74	1.00	0.03
f__Clostridiaceae	0.0477	0.0792	0.0129	0.0176	0.0000	0.27	0.79	1.00	0.03
f__Prevotellaceae	0.1518	0.1717	0.0454	0.0656	0.0000	0.30	0.79	1.00	0.03
f__Peptostreptococcaceae	0.0275	0.0623	0.0088	0.0134	0.0000	0.32	0.76	1.00	0.03
f__Rhodobacteraceae	0.0019	0.0057	0.0054	0.0059	0.0020	2.82	0.76	1.00	0.03
f__Nocardioideae	0.0004	0.0016	0.0013	0.0019	0.0037	3.58	0.75	1.00	0.03
f__Sphingomonadaceae	0.0047	0.0091	0.0187	0.0202	0.0010	4.00	0.86	0.99	0.21
f__Bartonellaceae	0.0002	0.0014	0.0009	0.0012	0.0088	4.27	0.75	1.00	0.03
f__Cellulomonadaceae	0.0001	0.0009	0.0006	0.0009	0.0084	4.48	0.74	1.00	0.03
f__Lactobacillaceae	0.0162	0.0224	0.0733	0.0967	0.0042	4.52	0.83	0.99	0.21
f__Rhizobiaceae	0.0022	0.0040	0.0102	0.0125	0.0023	4.62	0.83	1.00	0.28

10

20

30

40

f__[Fimbriimonada ceae]	0.000 2	0.000 7	0.000 9	0.001 3	0.007 5	5.14	0.77	1.00	0.0 7
f__Dermacoccaceae	0.000 3	0.001 0	0.001 8	0.002 5	0.004 7	5.58	0.81	0.99	0.1 4
f__Leptotrichiaceae	0.000 7	0.002 7	0.004 2	0.005 5	0.002 1	5.93	0.82	0.99	0.0 7
f__Coriobacteriaceae	0.004 0	0.008 1	0.025 1	0.036 3	0.004 6	6.33	0.80	0.99	0.1 7
f__Xenococcaceae	0.000 1	0.000 5	0.000 6	0.000 9	0.004 9	6.72	0.81	0.99	0.1 4
f__Aeromonadaceae	0.000 1	0.000 6	0.000 9	0.001 3	0.003 5	7.11	0.82	0.99	0.1 0
f__Geodermatophil aceae	0.000 2	0.000 8	0.001 3	0.001 8	0.002 3	7.46	0.83	0.99	0.1 7
f__Bdellovibrionaceae	0.000 0	0.000 2	0.000 6	0.000 9	0.003 8	23.48	0.80	1.00	0.2 4

10

20

【 0 0 7 3 】

糞便内細菌由来小胞を属 (genus) レベルで分析した結果、rc4-4、Proteus、Catenibacterium、Mucispirillum、Eubacterium、Turicibacter、Alloiococcus、Halomonas、Prevotella、Dialister、Anaerostipes、SMB53、Faecalibacterium、Blautia、Capnocytophaga、Sphingomonas、Lactobacillus、Fimbriimonas、Dermacoccus、Achromobacter、Novosphingobium、Sneathia、Agrobacterium、Blastomonas、Bdellovibrio、Alkanindiges、Roseateles、およびShuttleworthia属細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸癌に対する診断的性能が有意に現れた (表6および図6参照)。

30

【 0 0 7 4 】

【表 6】

Taxon	対照群		大腸癌		t-test		AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio			
g__rc4-4	0.0010	0.0035	0.0000	0.0000	0.0000	0.01	0.80	1.00	0.03
g__Proteus	0.0121	0.0272	0.0005	0.0011	0.0000	0.04	0.80	1.00	0.03
g__Catenibacterium	0.0014	0.0047	0.0002	0.0004	0.0000	0.11	0.75	1.00	0.03
g__Mucispirillum	0.0004	0.0018	0.0001	0.0003	0.0006	0.16	0.74	1.00	0.03
g__[Eubacterium]	0.0008	0.0020	0.0001	0.0003	0.0000	0.16	0.74	1.00	0.03
g__Turicibacter	0.0148	0.0493	0.0024	0.0053	0.0000	0.16	0.75	1.00	0.03
g__Alloiococcus	0.0004	0.0025	0.0001	0.0002	0.0086	0.16	0.73	1.00	0.03
g__Halomonas	0.0006	0.0024	0.0002	0.0003	0.0027	0.29	0.73	1.00	0.03
g__Prevotella	0.1518	0.1717	0.0454	0.0656	0.0000	0.30	0.79	1.00	0.03
g__Dialister	0.0063	0.0186	0.0020	0.0027	0.0001	0.32	0.75	1.00	0.03
g__Anaerostipes	0.0006	0.0014	0.0002	0.0005	0.0020	0.36	0.74	1.00	0.03
g__SMB53	0.0011	0.0018	0.0004	0.0007	0.0002	0.39	0.76	1.00	0.00
g__Faecalibacterium	0.0681	0.0882	0.0285	0.0584	0.0020	0.42	0.77	1.00	0.03
g__Blautia	0.0037	0.0100	0.0017	0.0017	0.0009	0.45	0.74	1.00	0.03
g__Capnocytoph	0.0003	0.0008	0.0007	0.0009	0.0052	2.59	0.75	1.00	0.03

10

20

30

40

aga									
g_Sphingomonas	0.0032	0.0059	0.0128	0.0138	0.0011	3.95	0.85	0.99	0.28
g_Lactobacillus	0.0160	0.0223	0.0731	0.0966	0.0041	4.58	0.83	0.99	0.21
g_Fimbriimonas	0.0002	0.0007	0.0009	0.0013	0.0079	5.10	0.77	1.00	0.07
g_Dermacoccus	0.0003	0.0010	0.0018	0.0025	0.0047	5.58	0.81	0.99	0.14
g_Achromobacter	0.0001	0.0003	0.0005	0.0008	0.0065	6.93	0.83	0.99	0.17
g_Novosphingobium	0.0002	0.0009	0.0014	0.0021	0.0046	7.84	0.82	0.99	0.10
g_Sneathia	0.0002	0.0019	0.0038	0.0050	0.0009	17.60	0.85	1.00	0.28
g_Agrobacterium	0.0002	0.0006	0.0036	0.0047	0.0005	20.68	0.87	1.00	0.41
g_Blastomonas	0.0000	0.0002	0.0006	0.0008	0.0012	22.87	0.84	0.99	0.31
g_Bdellovibrio	0.0000	0.0002	0.0006	0.0009	0.0038	23.63	0.80	1.00	0.24
g_Alkanindiges	0.0000	0.0002	0.0008	0.0014	0.0037	26.94	0.85	1.00	0.28
g_Roseateles	0.0000	0.0002	0.0011	0.0020	0.0086	51.47	0.83	0.99	0.31
g_Shuttleworthia	0.0000	0.0003	0.0020	0.0034	0.0043	51.55	0.84	1.00	0.34

【 0 0 7 5 】

実施例 5 . 正常ヒトと大腸癌患者の尿から分離した細菌由来小胞メタゲノム分析基盤大腸癌診断模型

前記実施例 3 の方法で、大腸癌患者 3 8 人と正常ヒト 3 8 人の尿から小胞を分離した後、メタゲノムシーケンシングを行った。診断模型の開発は、まず、t - t e s t で二つの群間の p 値が 0 . 0 5 以下であり、二つの群間に 2 倍以上違いが生じる菌株を選定した後、l o g i s t i c r e g r e s s i o n a n a l y s i s 方法で診断的性指標である AUC (a r e a u n d e r c u r v e)、敏感度、および特異度を算出した。

【 0 0 7 6 】

尿内細菌由来小胞を門 (p h y l u m) レベルで分析した結果、P r o t e o b a c t e r i a、および E u r y a r c h a e o t a 門細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断

10

20

30

40

50

モデルを開発したとき、大腸癌に対する診断的性能が有意に現れた（表7および図7参照）。

【0077】

【表7】

Taxon	対照群		大腸癌		t-test	Ratio	AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value				
p__Proteobacteria	0.5379	0.1871	0.2394	0.0820	0.0000	0.45	0.94	0.84	0.87
p__Euryarchaeota	0.0000	0.0001	0.0021	0.0021	0.0000	70.49	0.90	0.97	0.71

10

【0078】

尿内細菌由来小胞を綱(class)レベルで分析した結果、Gamma proteobacteria、Clostridia、およびMethanobacteria綱細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸癌に対する診断的性能が有意に現れた（表8および図8参照）。

20

【0079】

【表8】

Taxon	対照群		大腸癌		t-test	Ratio	AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value				
c__Gammaproteobacteria	0.4431	0.2104	0.1776	0.0577	0.0000	0.40	0.90	0.76	0.87
c__Clostridia	0.1286	0.0723	0.2752	0.0844	0.0000	2.14	0.93	0.87	0.82
c__Methanobacteria	0.0000	0.0001	0.0020	0.0021	0.0000	67.36	0.90	0.97	0.68

30

40

【0080】

尿内細菌由来小胞を目(order)レベルで分析した結果、Desulfobacterales、Stramenopiles、Pseudomonadales、Clostridiales、Turicibacterales、Desulfovibrionales、Oceanospirillales、およびMethanobacteriales目細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸癌に対する診断的性能が有意に現れた（表9および図9参照）。

50

【 0 0 8 1 】

【 表 9 】

Taxon	対照群		大腸癌		t-test	Ratio	AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value				
o__Desulfobacterales	0.0012	0.0027	0.0000	0.0000	0.0078	0.00	0.77	0.53	0.76
o__Stramenopiles	0.0055	0.0083	0.0001	0.0004	0.0003	0.02	0.82	0.58	0.87
o__Pseudomonadales	0.3124	0.1910	0.0622	0.0401	0.0000	0.20	0.93	0.87	0.92
o__Clostridiales	0.1284	0.0725	0.2751	0.0843	0.0000	2.14	0.93	0.87	0.82
o__Turicibacterales	0.0017	0.0026	0.0038	0.0040	0.0075	2.27	0.72	0.71	0.61
o__Desulfovibrionales	0.0001	0.0005	0.0009	0.0010	0.0001	6.78	0.79	0.89	0.58
o__Oceanospirillales	0.0005	0.0012	0.0038	0.0073	0.0098	7.70	0.84	0.87	0.58
o__Methanobacteriales	0.0000	0.0001	0.0020	0.0021	0.0000	67.36	0.90	0.97	0.68

10

20

30

【 0 0 8 2 】

尿内細菌由来小胞を科 (family) レベルで分析した結果、Moraxellaceae、Pseudomonadaceae、Streptococcaceae、Turicibacteraceae、Veillonellaceae、Bacteroidaceae、Aerococcaceae、Comamonadaceae、Clostridiaceae、Paraprevotellaceae、Christensenellaceae、Ruminococcaceae、Corynebacteriaceae、Gordoniaceae、Mycobacteriaceae、Desulfovibrionaceae、Halomonadaceae、Alcaligenaceae、Barnesiellaceae、Methanobacteriaceae、およびRikenellaceae科細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸癌に対する診断的性能が有意に現れた(表10および図10参照)。

40

【 0 0 8 3 】

【表 10】

Taxon	对照群		大腸癌		t-test		AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio			
f_Moraxellaceae	0.1810	0.1401	0.0313	0.0220	0.0000	0.17	0.93	0.87	0.87
f_Pseudomonadaceae	0.1314	0.0973	0.0306	0.0204	0.0000	0.23	0.90	0.82	0.89
f_Streptococcaeae	0.0180	0.0126	0.0383	0.0167	0.0000	2.13	0.89	0.79	0.87
f_Turicibacteraceae	0.0017	0.0026	0.0038	0.0040	0.0075	2.27	0.72	0.71	0.61
f_Veillonellaceae	0.0070	0.0083	0.0168	0.0074	0.0000	2.41	0.85	0.71	0.74
f_Bacteroidaceae	0.0212	0.0207	0.0517	0.0381	0.0001	2.44	0.84	0.82	0.74
f_Aerococcaceae	0.0021	0.0033	0.0052	0.0059	0.0057	2.51	0.74	0.74	0.61
f_Comamonadaceae	0.0027	0.0036	0.0071	0.0062	0.0003	2.63	0.76	0.76	0.63
f_Clostridiaceae	0.0100	0.0114	0.0299	0.0205	0.0000	2.99	0.86	0.79	0.71
f_[Paraprevote	0.0012	0.0036	0.0038	0.0033	0.0017	3.11	0.82	0.82	0.

10

20

30

40

llaceae]									63
f_Christensene llaceae	0.0004	0.0013	0.0014	0.0014	0.0040	3.16	0.74	0.87	0. 68
f_Ruminococc aceae	0.0379	0.0431	0.1280	0.0390	0.0000	3.38	0.95	0.92	0. 87
f_Corynebacte riaceae	0.0090	0.0097	0.0366	0.0197	0.0000	4.07	0.96	0.89	0. 87
f_Gordoniacea e	0.0001	0.0005	0.0004	0.0006	0.0081	5.03	0.78	0.76	0. 68
f_Mycobacteri aceae	0.0002	0.0008	0.0009	0.0015	0.0090	5.82	0.76	0.92	0. 58
f_Desulfovibri onaceae	0.0001	0.0005	0.0009	0.0010	0.0001	6.78	0.79	0.89	0. 58
f_Halomonada ceae	0.0002	0.0008	0.0018	0.0022	0.0001	9.40	0.88	0.92	0. 66
f_Alcaligenace ae	0.0001	0.0004	0.0018	0.0017	0.0000	15.77	0.90	0.95	0. 79
f_[Barnesiellac eae]	0.0001	0.0004	0.0016	0.0018	0.0000	24.08	0.84	0.95	0. 66
f_Methanobact eriaceae	0.0000	0.0001	0.0020	0.0021	0.0000	67.36	0.90	0.97	0. 68
f_Rikenellacea e	0.0000	0.0002	0.0059	0.0040	0.0000	153.18	0.98	0.97	0. 92

10

20

30

40

【 0 0 8 4 】

尿内細菌由来小胞を属 (g e n u s) レベルで分析した結果、 R h i z o b i u m 、 P

50

roteus、Morganelia、Acinetobacter、Pseudomonas、SMB53、Enterococcus、Lactococcus、Turicibacter、Coprococcus、Bacteroides、Dorea、Streptococcus、Lachnospira、Ruminococcus、Corynebacterium、Comamonas、Gordonia、Paraprevotella、Mycobacterium、Roseburia、Dialister、Slackia、Escherichia、Phascolarctobacterium、Sutterella、Virgibacillus、Eggerthella、Halomonas、Citrobacter、Roseomonas、Alloiococcus、Serratia、Methanobrevibacter、およびBilophila属細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸癌に対する診断的性能が有意に現れた(表11および図11参照)。

【0085】

【表 1 1】

Taxon	対照群		大腸癌		t-test	Ratio	AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value				
g__Rhizobium	0.0056	0.0056	0.0000	0.0000	0.0000	0.00	1.00	1.00	1.00
g__Proteus	0.0132	0.0192	0.0006	0.0010	0.0003	0.04	0.87	0.76	0.95
g__Morganella	0.0211	0.0295	0.0013	0.0060	0.0002	0.06	0.84	0.61	0.84
g__Acinetobacter	0.1683	0.1396	0.0172	0.0138	0.0000	0.10	0.94	0.84	0.95
g__Pseudomonas	0.1288	0.0965	0.0286	0.0201	0.0000	0.22	0.90	0.82	0.89
g__SMB53	0.0034	0.0046	0.0008	0.0012	0.0017	0.23	0.73	0.58	0.66
g__Enterococcus	0.0086	0.0108	0.0023	0.0024	0.0010	0.26	0.74	0.50	0.82
g__Lactococcus	0.0035	0.0039	0.0015	0.0019	0.0074	0.44	0.67	0.50	0.66
g__Turicibacter	0.0017	0.0026	0.0038	0.0040	0.0075	2.27	0.72	0.71	0.61
g__Coprococcus	0.0036	0.0043	0.0083	0.0052	0.0000	2.31	0.81	0.74	0.76
g__Bacteroides	0.0212	0.0207	0.0517	0.0381	0.0001	2.44	0.84	0.82	0.74
g__Dorea	0.0010	0.0015	0.0025	0.0024	0.0011	2.55	0.80	0.79	0.66
g__Streptococcus	0.0143	0.0122	0.0366	0.0166	0.0000	2.56	0.90	0.79	0.87
g__Lachnospira	0.0005	0.0012	0.0017	0.0020	0.0020	3.54	0.76	0.82	0.66

10

20

30

40

g__Ruminococcus]	0.001 0	0.001 5	0.004 0	0.003 1	0.000 0	3.83	0.85	0.79	0.5 8
g__Corynebacteriu m	0.009 0	0.009 7	0.036 6	0.019 7	0.000 0	4.07	0.96	0.89	0.8 7
g__Comamonas	0.000 3	0.001 0	0.001 3	0.001 8	0.005 0	4.32	0.77	0.87	0.6 1
g__Ruminococcus	0.003 0	0.004 3	0.014 8	0.007 3	0.000 0	4.94	0.94	0.87	0.8 2
g__Gordonia	0.000 1	0.000 5	0.000 4	0.000 6	0.008 1	5.03	0.78	0.76	0.6 8
g__Paraprevotella	0.000 2	0.000 7	0.001 0	0.001 4	0.001 5	5.70	0.80	0.89	0.6 6
g__Mycobacterium	0.000 2	0.000 8	0.000 9	0.001 5	0.009 0	5.82	0.76	0.92	0.5 8
g__Roseburia	0.000 4	0.001 7	0.003 2	0.002 8	0.000 0	8.45	0.93	0.92	0.7 9
g__Dialister	0.000 5	0.001 2	0.006 5	0.004 6	0.000 0	13.84	0.94	0.92	0.8 7
g__Slackia	0.000 0	0.000 3	0.000 7	0.001 4	0.006 2	15.14	0.77	0.92	0.5 8
g__Escherichia	0.000 1	0.000 1	0.000 9	0.000 8	0.000 0	15.98	0.95	0.95	0.8 4
g__Phascolarctoba cterium	0.000 1	0.000 7	0.002 6	0.003 0	0.000 0	20.76	0.93	0.97	0.8 4
g__Sutterella	0.000 1	0.000 3	0.001 3	0.001 5	0.000 0	20.99	0.86	0.95	0.7 4
g__Virgibacillus	0.000 0	0.000 1	0.000 8	0.001 0	0.000 0	21.74	0.83	0.89	0.6 1
g__Eggerthella	0.000 0	0.000 1	0.000 5	0.001 0	0.004 4	24.82	0.76	0.76	0.5 5
g__Halomonas	0.000 1	0.000 3	0.001 7	0.002 2	0.000 0	26.50	0.91	0.95	0.7 6
g__Citrobacter	0.000 3	0.000 5	0.008 9	0.005 6	0.000 0	30.07	0.99	0.97	0.9 2

10

20

30

40

g_Roseomonas	0.000 0	0.000 2	0.001 2	0.001 6	0.000 1	35.67	0.85	0.97	0.5 8
g_Alloiococcus	0.000 0	0.000 1	0.002 2	0.005 0	0.009 7	174.52	0.88	0.95	0.7 4
g_Serratia	0.000 0	0.000 0	0.000 6	0.001 0	0.000 7	195.10	0.81	0.92	0.5 5
g_Methanobrevibacter	0.000 0	0.000 0	0.002 0	0.002 1	0.000 0	555.27	0.92	1.00	0.7 4
g_Bilophila	0.000 0	0.000 0	0.000 5	0.000 8	0.000 3	873.83	0.79	0.92	0.5 3

10

【0086】

実施例6. 大腸ポリープ患者と大腸癌患者の糞便から分離した細菌由来小胞メタゲノム分析基盤大腸癌診断模型

前記実施例3の方法で、大腸癌患者29人と大腸ポリープ患者27人の糞便から小胞を分離した後、メタゲノムシーケンシングを行った。診断模型の開発は、まず、t-testで二つの群間のp値が0.05以下であり、二つの群間に2倍以上違いが生じる菌株を選定した後、logistic regression analysis方法で診断的性能指標であるAUC (area under curve)、敏感度、および特異度を算出した。

20

【0087】

糞便内細菌由来小胞を門 (phylum) レベルで分析した結果、Spirochaetes門細菌をバイオマーカーで診断模型を開発したとき、大腸癌に対する診断的性能が有意に現れた (表12および図12参照)。

【0088】

【表12】

30

Taxon	大腸ポリープ		大腸癌		t-test		AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio			
p_Spirochaetes	0.0005	0.0009	0.0001	0.0001	0.0216	0.12	0.87	0.74	0.79

40

【0089】

糞便内細菌由来小胞を綱 (class) レベルで分析した結果、Spirochaetes、およびAcidobacteria-6綱細菌をバイオマーカーで診断模型を開発したとき、大腸癌に対する診断的性能が有意に現れた (表13および図13参照)。

【0090】

【表 1 3】

Taxon	大腸ポリープ		大腸癌		t-test	Ratio	AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value				
c__Spirochaetes	0.0005	0.0009	0.0001	0.0001	0.0202	0.11	0.87	0.78	0.83
c__Acidobacteria-6	0.0003	0.0004	0.0007	0.0010	0.0237	2.92	0.85	0.81	0.69

10

【 0 0 9 1】

糞便内細菌由来小胞を目 (order) レベルで分析した結果、Spirochaetales 目細菌をバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸癌に対する診断的性能が有意に現れた (チケット 1 4 および図 1 4 参照)。

【 0 0 9 2】

20

【表 1 4】

Taxon	大腸ポリープ		大腸癌		t-test	Ratio	AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value				
o__Spirochaetales	0.0005	0.0009	0.0001	0.0001	0.0202	0.11	0.87	0.78	0.83

30

【 0 0 9 3】

糞便内細菌由来小胞を科 (family) レベルで分析した結果、Spirochaetaceae、および S 2 4 - 7 科細菌をバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸癌に対する診断的性能が有意に現れた (チケット 1 5 および図 1 5 参照)。

【 0 0 9 4】

【表 15】

Taxon	大腸ポリープ		大腸癌		t-test		AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio			
f_Spirochaetaceae	0.0005	0.0009	0.0001	0.0001	0.0202	0.11	0.87	0.78	0.83
f_S24-7	0.0021	0.0053	0.0103	0.0206	0.0492	4.93	0.84	0.81	0.69

10

【0095】

糞便内細菌由来小胞を属 (genus) レベルで分析した結果、*Treponema*、*Dialister*、および *Oscillospira* 属細菌をバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸癌に対する診断的性能が有意に現れた (表 16 および図 16 参照)。

20

【0096】

【表 16】

Taxon	大腸ポリープ		大腸癌		t-test		AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio			
g_Treponema	0.0005	0.0009	0.0001	0.0001	0.0202	0.11	0.8685	0.7778	0.8276
g_Dialister	0.0103	0.0152	0.0020	0.0027	0.0106	0.20	0.8672	0.7778	0.8276
g_Oscillospira	0.0023	0.0019	0.0074	0.0109	0.0212	3.18	0.8378	0.7778	0.7241

30

40

【0097】

実施例 7 . 大腸ポリープ患者と大腸癌患者の尿から分離した細菌由来小胞メタゲノム分析基盤大腸癌診断モデル

前記実施例 3 の方法で、大腸癌患者 26 人と大腸ポリープ患者 38 人の尿から小胞を分離した後、メタゲノムシーケンシングを行った。診断モデルの開発は、まず、t-test で二つの群間の p 値が 0.05 以下であり、二つの群間に 2 倍以上違いが生じる菌株を選定した後、logistic regression analysis 方法で診断的性

50

能指標であるAUC (area under curve)、敏感度、および特異度を算出した。

【0098】

尿内細菌由来小胞を目 (order) レベルで分析した結果、Myxococcales 目細菌で診断模型を開発したとき、大腸癌に対する診断的性能が有意に現れた (表17 および図17参照)。

【0099】

【表17】

Taxon	大腸ポリープ		大腸癌		t-test		AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio			
o_Myxococcales	0.0000	0.0001	0.0005	0.0013	0.0442	14.52	0.78	0.69	0.82

10

【0100】

尿内細菌由来小胞を属 (genus) レベルで分析した結果、Eubacterium 属細菌で診断模型を開発したとき、大腸癌に対する診断的性能が有意に現れた (表18 および図18参照)。

【0101】

【表18】

Taxon	大腸ポリープ		大腸癌		t-test		AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio			
g_[Eubacterium]	0.0009	0.0011	0.0024	0.0028	0.0040	2.72	0.79	0.62	0.79

20

30

【0102】

実施例8. 正常ヒトと大腸ポリープの糞便から分離した細菌由来小胞メタゲノム分析基盤大腸ポリープ診断模型

前記実施例3の方法で、大腸癌患者27人と正常ヒト358人の糞便から小胞を分離した後、メタゲノムシーケンシングを行った。診断模型の開発は、まず、t-testで二つの群間のp値が0.05以下であり、二つの群間に2倍以上違いが生じる菌株を選定した後、logistic regression analysis方法で診断的性能指標であるAUC (area under curve)、敏感度、および特異度を算出した。

40

【0103】

糞便内細菌由来小胞を門 (phylum) レベルで分析した結果、Actinobacteria 門細菌で診断模型を開発したとき、大腸ポリープに対する診断的性能が有意に現れた (表19 および図19参照)。

【0104】

50

【表 19】

Taxon	対照群		大腸ポリープ		t-test		AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio			
p__Actinobacteria	0.0353	0.0403	0.0826	0.0680	0.0016	2.34	0.84	0.99	0.11

10

【0105】

糞便内細菌由来小胞を綱(class)レベルで分析した結果、Betaproteobacteria、およびSolibacteres綱細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸ポリープに対する診断的性能が有意に現れた(表20および図20参照)。

【0106】

【表 20】

Taxon	対照群		大腸ポリープ		t-test		AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio			
c__Betaproteobacteria	0.0151	0.0370	0.0391	0.0369	0.0013	2.58	0.82	1.00	0.00
c__Solibacteres	0.0001	0.0006	0.0005	0.0007	0.0093	4.95	0.83	1.00	0.00

20

30

【0107】

糞便内細菌由来小胞を目(order)レベルで分析した結果、Burkholderiales、Sphingomonadales、およびSolibacterales目細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸ポリープに対する診断的性能が有意に現れた(表21および図21参照)。

【0108】

【表 2 1】

Taxon	対照群		大腸ポリープ		t-test		AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio			
o__Burkholderiales	0.0121	0.0358	0.0367	0.0365	0.0007	3.02	0.82	1.00	0.00
o__Sphingomonadales	0.0050	0.0097	0.0215	0.0216	0.0006	4.33	0.87	0.99	0.19
o__Solibacterales	0.0001	0.0006	0.0005	0.0007	0.0091	4.98	0.83	1.00	0.00

10

【 0 1 0 9 】

糞便内細菌由来小胞を科 (family) レベルで分析した結果、Rhizobiales、およびSphingomonadales科細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸ポリープに対する診断的性能が有意に現れた (表 2 2 および図 2 2 参照)。

20

【 0 1 1 0 】

【表 2 2】

Taxon	対照群		大腸ポリープ		t-test		AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio			
f__Rhizobiales	0.0022	0.0040	0.0080	0.0105	0.0091	3.64	0.83	0.99	0.19
f__Sphingomonadales	0.0047	0.0091	0.0208	0.0210	0.0006	4.46	0.87	0.99	0.22

30

【 0 1 1 1 】

糞便内細菌由来小胞を属 (genus) レベルで分析した結果、Sphingomonas、Alkanindiges、およびRoseateles属細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸ポリープに対する診断的性能が有意に現れた (表 2 3 および図 2 3 参照)。

40

【 0 1 1 2 】

【表 2 3】

Taxon	対照群		大腸ポリープ		t-test		AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio			
g__Sphingomonas	0.0032	0.0059	0.0155	0.0164	0.0008	4.77	0.87	0.99	0.30
g__Alkanindiges	0.0000	0.0002	0.0008	0.0015	0.0097	26.73	0.84	1.00	0.26
g__Roseatelles	0.0000	0.0002	0.0006	0.0011	0.0078	30.88	0.85	0.99	0.22

10

【0113】

実施例 9 . 正常ヒトと大腸ポリープの尿から分離した細菌由来小胞メタゲノム分析基盤大腸ポリープ診断模型

20

前記実施例 3 の方法で、大腸癌患者 38 人と正常ヒト 38 人の尿から小胞を分離した後、メタゲノムシーケンシングを行った。診断模型の開発は、先に t - t e s t で二つの群間の p 値が 0 . 05 以下であり、二つの群間に 2 倍以上違いが生じる菌株を選定した後、logistic regression analysis 方法で診断的性能指標である AUC (area under curve)、敏感度、および特異度を算出した。

【0114】

尿内細菌由来小胞を門 (phylum) レベルで分析した結果、Proteobacteria、および Euryarchaeota 門細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断模型を開発したとき、大腸ポリープに対する診断的性能が有意に現れた (表 2 4 および図 2 4 参照)。

30

【0115】

【表 2 4】

Taxon	対照群		大腸ポリープ		t-test		AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio			
p__Proteobacteria	0.5379	0.1871	0.2416	0.0691	0.0000	0.45	0.92	0.82	0.88
p__Euryarchaeota	0.0000	0.0001	0.0024	0.0027	0.0001	82.21	0.90	1.00	0.73

40

【0116】

尿内細菌由来小胞を綱 (class) レベルで分析した結果、Gammaproteobacteria、Clostridia、Methanobacteria、および 4 C 0 d - 2 綱細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断模型を開発したとき、大腸ポリープに対する診断的性能が有意に現れた (表 2 5 および図 2 5 参照)。

50

【 0 1 1 7 】

【 表 2 5 】

Taxon	対照群		大腸ポリープ		t-test		AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio			
c__Gammaproteobacteria	0.4431	0.2104	0.1807	0.0511	0.0000	0.41	0.86	0.76	0.88
c__Clostridia	0.1286	0.0723	0.2804	0.0637	0.0000	2.18	0.94	0.87	0.77
c__Methanobacteria	0.0000	0.0001	0.0024	0.0027	0.0002	79.88	0.90	1.00	0.73
c__4C0d-2	0.0000	0.0000	0.0006	0.0011	0.0099	1952.62	0.81	0.92	0.38

10

20

【 0 1 1 8 】

尿内細菌由来小胞を目 (order) レベルで分析した結果、Stramenopiles、Pseudomonadales、Clostridiales、Oceanospirillales、Desulfovibrionales、およびMethanobacteriales目細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸ポリープに対する診断的性能が有意に現れた (表26および図26参照)。

【 0 1 1 9 】

【表 2 6】

Taxon	対照群		大腸ポリープ		t-test		Auc	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio			
o__Stramenopiles	0.0055	0.0083	0.0000	0.0000	0.0014	0.00	0.89	0.74	1.00
o__Pseudomonadales	0.3124	0.1910	0.0622	0.0414	0.0000	0.20	0.91	0.84	0.85
o__Clostridiales	0.1284	0.0725	0.2804	0.0637	0.0000	2.18	0.94	0.87	0.77
o__Oceanospirillales	0.0005	0.0012	0.0018	0.0015	0.0003	3.65	0.86	0.89	0.62
o__Desulfovibrionales	0.0001	0.0005	0.0010	0.0015	0.0064	7.61	0.83	0.92	0.54
o__Methanobacteriales	0.0000	0.0001	0.0024	0.0027	0.0002	79.88	0.90	1.00	0.73

10

20

【 0 1 2 0】

尿内細菌由来小胞を科 (family) レベルで分析した結果、Exiguobacteraceae、Moraxellaceae、Pseudomonadaceae、Rhizobiaceae、Streptococcaceae、Peptostreptococcaceae、Comamonadaceae、Veillonellaceae、Bacteroidaceae、Paraprevotellaceae、Ruminococcaceae、Corynebacteriaceae、Christensenellaceae、Odoribacteraceae、Desulfovibrionaceae、Halomonadaceae、Alcaligenaceae、Barnesiellaceae、Methanobacteriaceae、およびRikenellaceae科細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸ポリープに対する診断的性能が有意に現れた(表 2 7 および図 2 7 参照)。

30

【 0 1 2 1】

【表 27】

Taxon	対照群		大腸ポリープ		t-test	Ratio	AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value				
f__[Exiguobacteraceae]	0.0013	0.0026	0.0001	0.0003	0.0076	0.06	0.74	0.63	0.77
f__Moraxellaceae	0.1810	0.1401	0.0306	0.0235	0.0000	0.17	0.88	0.79	0.81
f__Pseudomonadaceae	0.1314	0.0973	0.0315	0.0201	0.0000	0.24	0.89	0.82	0.85
f__Rhizobiaceae	0.0068	0.0062	0.0025	0.0032	0.0007	0.37	0.83	0.79	0.62
f__Streptococcaceae	0.0180	0.0126	0.0373	0.0099	0.0000	2.08	0.90	0.87	0.85
f__Peptostreptococcaceae	0.0009	0.0017	0.0023	0.0017	0.0029	2.42	0.84	0.95	0.65
f__Comamonadaceae	0.0027	0.0036	0.0067	0.0067	0.0090	2.48	0.77	0.79	0.46
f__Veillonellaceae	0.0070	0.0083	0.0186	0.0056	0.0000	2.67	0.86	0.79	0.77
f__Bacteroidaceae	0.0212	0.0207	0.0571	0.0217	0.0000	2.69	0.92	0.89	0.73
f__[Paraprevotellaceae]	0.0012	0.0036	0.0037	0.0021	0.0008	3.07	0.85	0.82	0.65
f__Ruminococcaceae	0.0379	0.0431	0.1325	0.0396	0.0000	3.50	0.93	0.87	0.85
f__Corynebacteriaceae	0.0090	0.0097	0.0367	0.0159	0.0000	4.09	0.97	0.95	0.85
f__Christensenellaceae	0.0004	0.0013	0.0018	0.0021	0.0042	4.23	0.84	0.92	0.62
f__[Odoribacteraceae]	0.0005	0.0022	0.0023	0.0022	0.0026	4.30	0.83	0.89	0.54

10

20

30

40

f__Desulfovibrio naceae	0.0001	0.0005	0.0010	0.0015	0.0064	7.61	0.83	0.92	0.54
f__Halomonadac eae	0.0002	0.0008	0.0016	0.0015	0.0001	8.48	0.91	0.97	0.73
f__Alcaligenacea e	0.0001	0.0004	0.0014	0.0017	0.0006	12.38	0.82	0.92	0.50
f__[Barnesiellace ae]	0.0001	0.0004	0.0022	0.0031	0.0015	33.09	0.93	0.97	0.77
f__Methanobacte riaceae	0.0000	0.0001	0.0024	0.0027	0.0002	79.88	0.90	1.00	0.73
f__Rikenellaceae	0.0000	0.0002	0.0054	0.0033	0.0000	139.26	0.97	0.97	0.92

10

【 0 1 2 2 】

尿内細菌由来小胞を属 (genus) レベルで分析した結果、Rhizobium、Morganella、Proteus、Exiguobacterium、Acinetobacter、Pseudomonas、SMB53、Lactococcus、Coproccoccus、Streptococcus、Bacteroides、Ruminococcus、Corynebacterium、Odoribacter、Clostridium、Comamonas、Paraprevotella、Roseburia、Citrobacter、Klebsiella、Virgibacillus、Slackia、Dialister、Phascolarctobacterium、Sutterella、Halomonas、Roseomonas、およびMethanobrevibacter属細菌で一つ以上のバイオマーカーで診断モデルを開発したとき、大腸ポリープに対する診断的性能が有意に現れた (表 2 8 および図 2 8 参照) 。

20

30

【 0 1 2 3 】

【表 2 8】

Taxon	対照群		大腸ポリープ		t-test	Ratio	AUC	sensitivity	specificity
	Mean	SD	Mean	SD	p-value				
g__Rhizobium	0.0056	0.0056	0.0000	0.0000	0.0000	0.00	0.99	0.95	1.00
g__Morganella	0.0211	0.0295	0.0003	0.0006	0.0001	0.01	0.82	0.63	0.85
g__Proteus	0.0132	0.0192	0.0003	0.0005	0.0002	0.02	0.91	0.82	0.96
g__Exiguobacterium	0.0013	0.0026	0.0001	0.0003	0.0078	0.06	0.74	0.63	0.77
g__Acinetobacter	0.1683	0.1396	0.0152	0.0123	0.0000	0.09	0.90	0.82	0.81
g__Pseudomonas	0.1288	0.0965	0.0296	0.0195	0.0000	0.23	0.89	0.82	0.81
g__SMB53	0.0034	0.0046	0.0010	0.0010	0.0039	0.30	0.78	0.74	0.69
g__Lactococcus	0.0035	0.0039	0.0014	0.0014	0.0029	0.39	0.75	0.71	0.62
g__Coprococcus	0.0036	0.0043	0.0084	0.0047	0.0001	2.35	0.82	0.87	0.73
g__Streptococcus	0.0143	0.0122	0.0358	0.0102	0.0000	2.50	0.90	0.87	0.81
g__Bacteroides	0.0212	0.0207	0.0571	0.0217	0.0000	2.69	0.92	0.89	0.73
g__[Ruminococcus]	0.0010	0.0015	0.0041	0.0039	0.0005	3.96	0.81	0.87	0.58
g__Corynebacterium	0.0090	0.0097	0.0367	0.0159	0.0000	4.09	0.97	0.95	0.85
g__Odoribacter	0.0002	0.0009	0.0010	0.0012	0.0050	4.31	0.82	0.92	0.54
g__Clostridium	0.0003	0.0011	0.0014	0.0015	0.0016	4.39	0.84	0.95	0.58

10

20

30

40

g__Ruminococcus	0.0030	0.0043	0.0145	0.0083	0.0000	4.84	0.91	0.89	0.73
g__Comamonas	0.0003	0.0010	0.0015	0.0020	0.0087	5.17	0.78	0.92	0.50
g__Paraprevotella	0.0002	0.0007	0.0012	0.0014	0.0010	6.62	0.85	0.92	0.62
g__Roseburia	0.0004	0.0017	0.0043	0.0029	0.0000	11.30	0.96	0.95	0.88
g__Citrobacter	0.0003	0.0005	0.0034	0.0020	0.0000	11.61	0.97	0.95	0.92
g__Klebsiella	0.0002	0.0006	0.0026	0.0042	0.0070	13.68	0.89	0.95	0.58
g__Virgibacillus	0.0000	0.0001	0.0006	0.0010	0.0074	15.87	0.75	0.92	0.42
g__Slackia	0.0000	0.0003	0.0008	0.0007	0.0000	16.11	0.88	0.95	0.65
g__Dialister	0.0005	0.0012	0.0082	0.0047	0.0000	17.52	0.95	0.97	0.85
g__Phascolarctobacterium	0.0001	0.0007	0.0023	0.0025	0.0002	18.69	0.88	0.97	0.65
g__Sutterella	0.0001	0.0003	0.0012	0.0017	0.0015	19.16	0.80	0.97	0.46
g__Halomonas	0.0001	0.0003	0.0015	0.0015	0.0001	22.99	0.91	0.95	0.73
g__Roseomonas	0.0000	0.0002	0.0026	0.0043	0.0052	78.36	0.93	0.97	0.77
g__Methanobrevibacter	0.0000	0.0000	0.0024	0.0027	0.0002	661.93	0.91	1.00	0.73

【 0 1 2 4 】

上記に記述した本発明の説明は、例示のためのものであり、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者は、本発明の技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態に容易に変形が可能であることを理解することができる。したがって、以上で記述した実施例は、すべての面において例示的なものであり、限定的でないものと理解しなければならない。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 1 2 5 】

10

20

30

40

50

本発明による細菌メタゲノム分析を通して大腸腫瘍を診断する方法は、被検体由来サンプルを利用して細菌メタゲノム分析を行って、特定細菌由来細胞外小胞の含量増減を分析することによって、大腸ポリープおよび大腸癌などの大腸腫瘍の発病危険度を予測し診断するのに利用することができる。環境に存在する細菌から分泌される細胞外小胞は、体内に吸収されて、炎症および癌の発生に直接的な影響を及ぼすことができ、大腸ポリープおよび大腸癌は、症状が現れる前に早期診断が難しいため、効率的な治療が難しいのが現状であるから、本発明による人体由来サンプルを利用した細菌または細菌由来細胞外小胞のメタゲノム分析を通して大腸ポリープおよび大腸癌などの大腸腫瘍発病の危険度をあらかじめ予測することによって、大腸腫瘍の危険群を早期に診断および予測して、適切な管理により発病時期を遅らせたり発病を予防することができ、発病後にも早期診断することができるので、大腸腫瘍の発病率を低下させ、治療効果を高めることができる。また、大腸ポリープあるいは大腸癌と診断された患者において本発明による細菌メタゲノム分析は、原因因子を予測して原因因子に対する露出を避けることによって、大腸ポリープおよび大腸癌の経過を良くしたり、再発を防止するのに利用することができる。

10

【 図 1 】

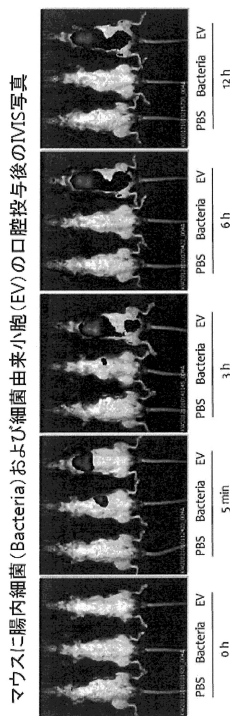


図 1 a

【 図 2 】

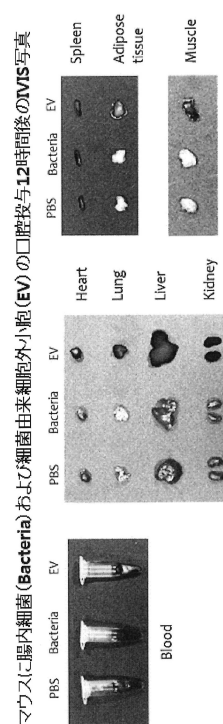
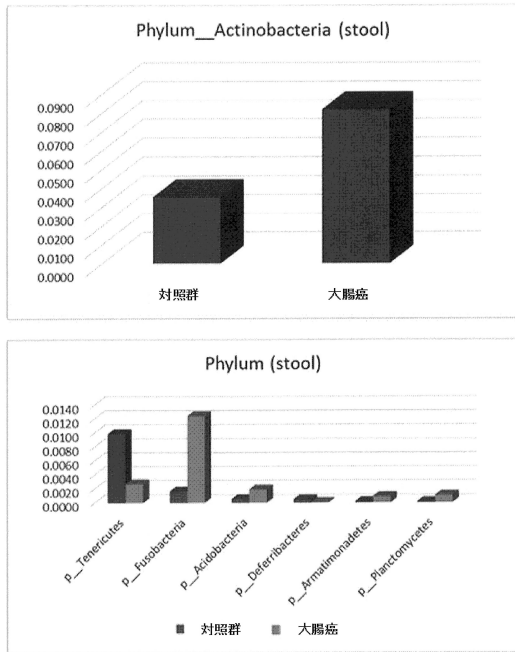


図 1 b

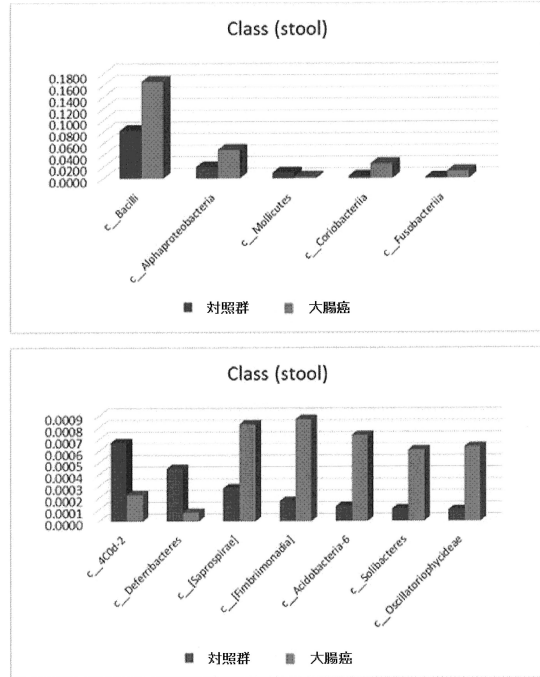
【 図 3 】

图 2



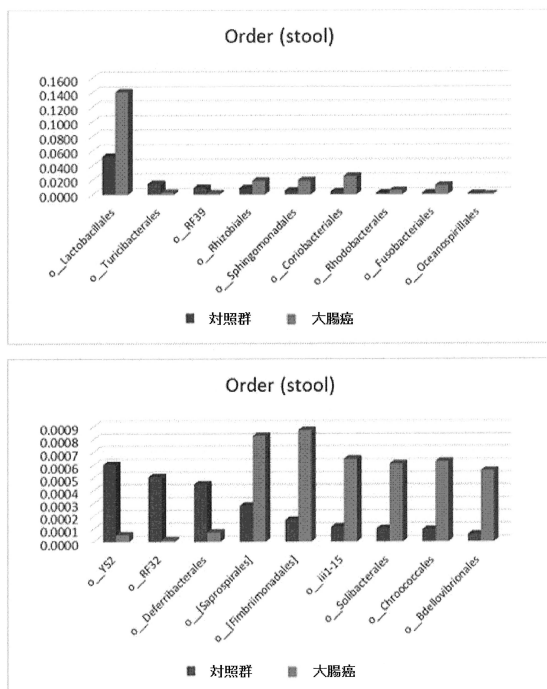
【 图 4 】

图 3



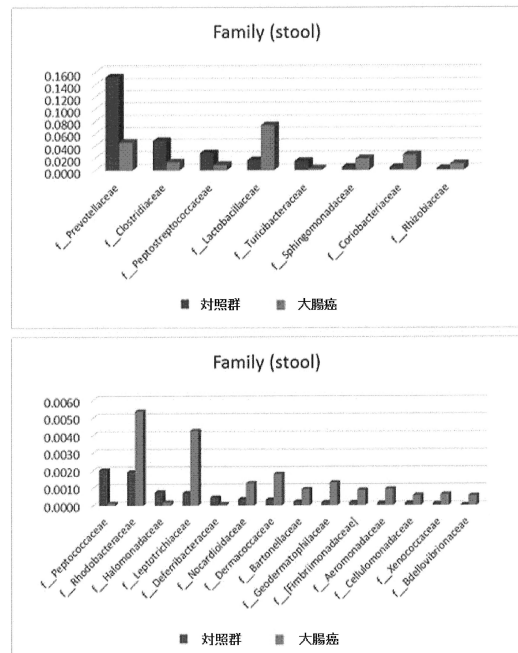
【 图 5 】

图 4



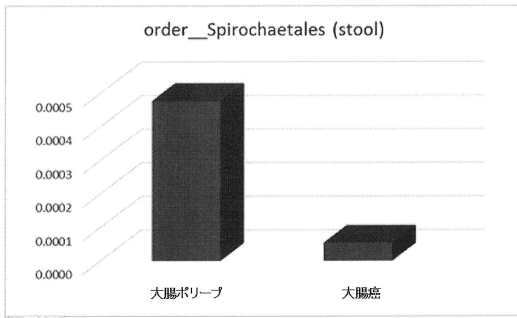
【 图 6 】

图 5



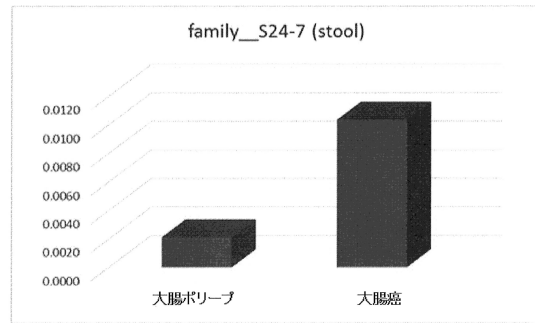
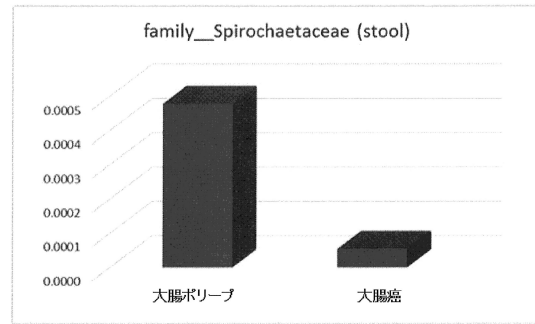
【 図 1 5 】

図 14



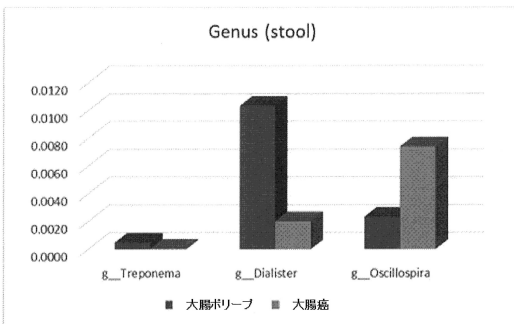
【 図 1 6 】

図 15



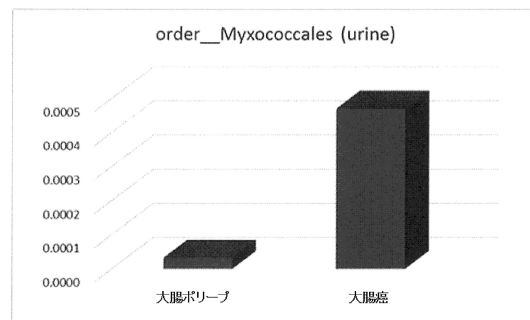
【 図 1 7 】

図 16



【 図 1 8 】

図 17



【 図 1 9 】

【 図 2 0 】

図 18

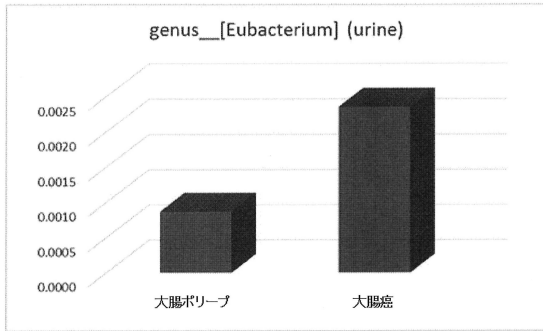
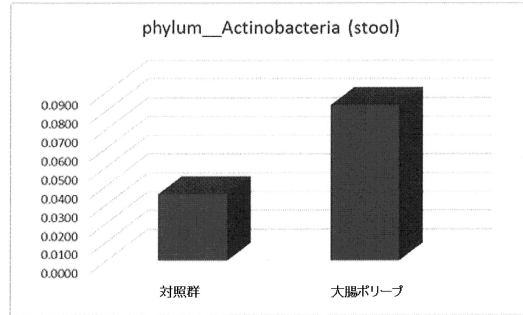


図 19



【 図 2 1 】

【 図 2 2 】

図 20

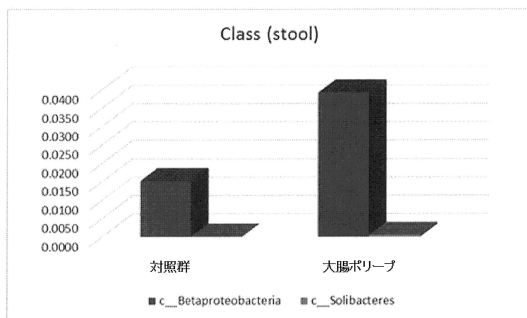
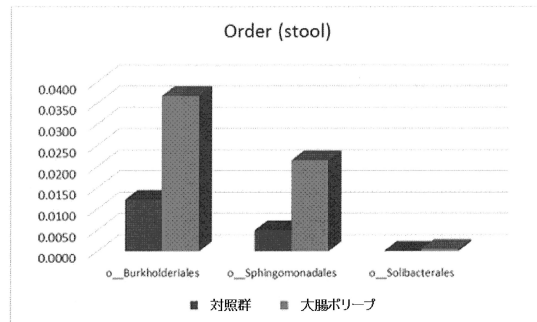
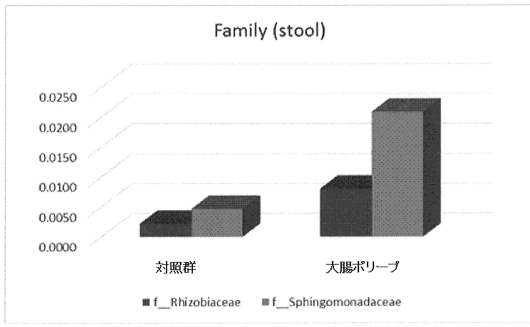


図 21



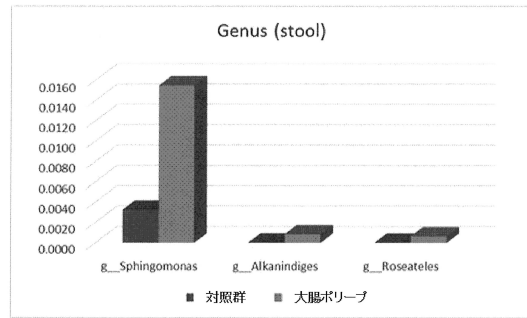
【 図 2 3 】

図 22



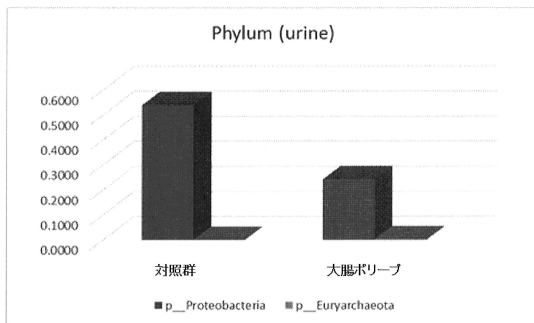
【 図 2 4 】

図 23



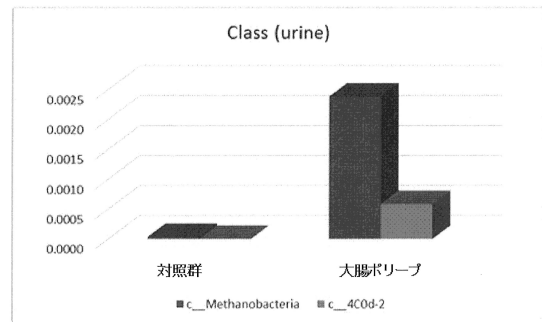
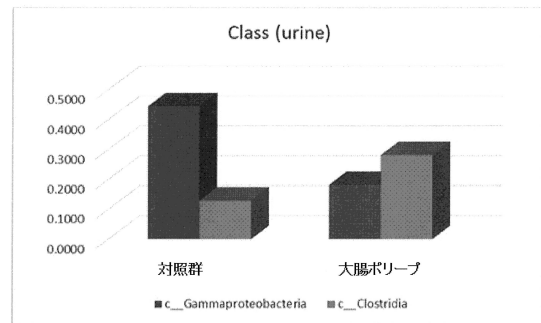
【 図 2 5 】

図 24



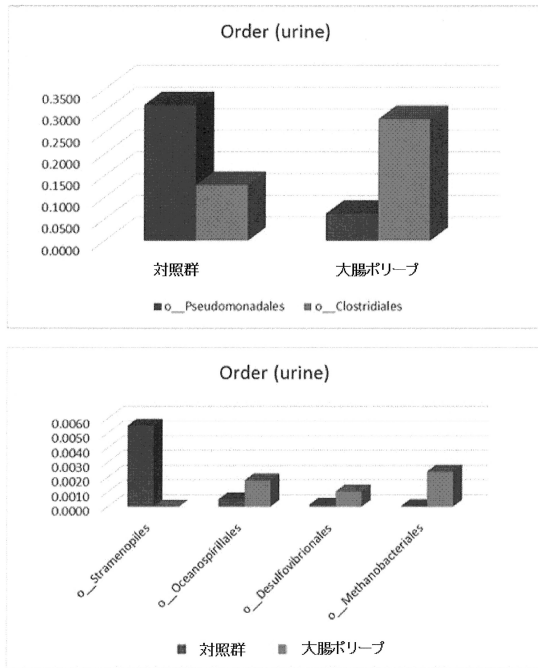
【 図 2 6 】

図 25



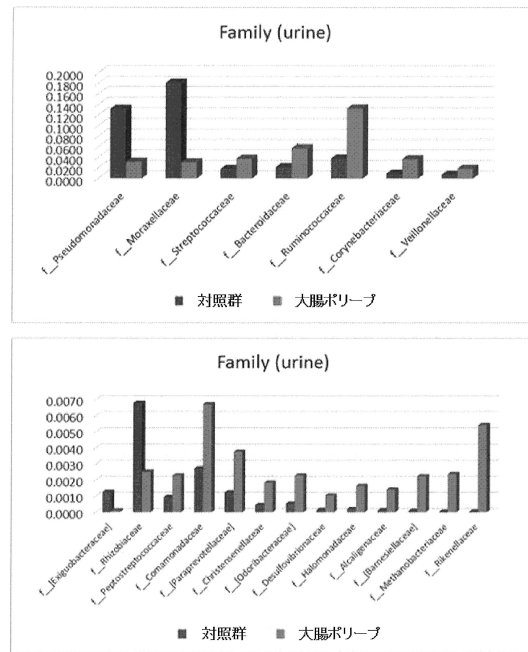
【 図 27 】

図 26



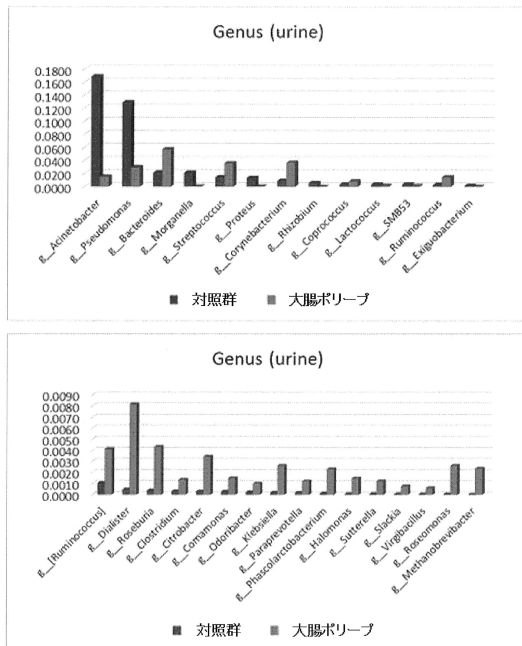
【 図 28 】

図 27



【 図 29 】

図 28



【配列表】

0006914552000001.app

フロントページの続き

審査官 山本 匡子

(56)参考文献 特表2013-503858(JP,A)
国際公開第2016/137164(WO,A1)
国際公開第2016/085356(WO,A1)
中国特許出願公開第105296590(CN,A)
中国特許出願公開第105132518(CN,A)
特表2013-521763(JP,A)
小林孝史,NGSの新たな利用法:16S rRNAメタゲノム解析のポイント プロトコールのご紹介,illumina[online],2014年5月9日,[retrieved on 19.2.2021],URL,https://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/2014_techsupport_session3.pdf

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N 15/00-90
C12Q 1/00-3/00
MEDLINE/BIOSIS/WPIDS/REGISTRY/CAPLUS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq