

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04757

研究課題名(和文) 局所感染により誘発される重度全身疾患発症メカニズムの解明とその治療薬の開発

研究課題名(英文) Prediction and prevention of serious systemic diseases induced by local infection of bacteria

研究代表者

和田 孝一郎 (Wada, Koichiro)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：90263467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では高病原性局所感染性細菌の検出、全身疾患発症メカニズムの解明、さらにそのメカニズムを基にした重度全身疾患発症の予防の可能性について検討を行った。健診時や臨床系各科、歯科医師会等の協力のもと口腔サンプルを収集し解析を行ったところ、糖尿病状態の悪化や好酸球性食道炎などいくつかの全身疾患と特定の口腔細菌との間に関連性が認められた。またこれらの細菌による全身疾患発症には、各細菌がもつ特定の分子が密接に関わっている可能性が示唆された。さらに全身疾患発症には特定の病原性細菌の保菌だけではなく、口腔細菌叢全体が重要であることも明らかになった。本研究の知見は全身疾患発症予防に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：There are few reports about the role of oral microbiota on the human health and systemic diseases. We, therefore, investigated roles of infection of high-virulent oral bacteria on the development of serious systemic diseases such as stroke, cardiovascular, and digestive diseases. Relationships between the prevalence of several high-virulent bacteria and several systemic diseases were observed. According to the exhaustive analysis of oral flora using next generation sequencer, different patterns of oral flora between the healthy subjects and the subjects with various chronic diseases were observed. These results indicate that the balance of total composition of oral flora might be important for maintenance of human health condition. Further investigations will provide us the important knowledge to predict and prevent various systemic diseases in future.

研究分野：薬理学、臨床薬理学、炎症・免疫

キーワード：全身疾患 局所感染 口腔細菌 循環器疾患 脳卒中 糖尿病 NASH 口腔-腸相関

1. 研究開始当初の背景

脳出血や脳梗塞に代表される「脳卒中」は、癌や心疾患に次いで高い死亡率を維持しており、日本人の3大死亡原因の一つである。また、脳卒中が発症した場合、死亡に至らなくても重篤な後遺症が残る場合が多く、以後のQuality of Lifeに重大な影響を与えてしまう。それ故に脳卒中の発症を予防することは、医療全体において非常に重要である。脳卒中の発症を予防する最も効果的な方法は、発症のリスクファクターを明らかにし、そのリスクを軽減することが重要であると考えられる。これまでに脳卒中のリスクファクターとして、高血圧、高脂血症などの代謝疾患、喫煙などが指摘されているが、その他については不明な点が多い。

我々はこれまでに口腔粘膜や鼻粘膜局所に存在・感染している細菌が引き起こす重度全身疾患発症に関する研究を進めてきた。これら一連の研究により口腔細菌による動脈硬化誘発のメカニズムを解明した。さらにこの過程で脳出血を誘発する特殊な細菌が存在することを世界で初めて発見した。この菌の保菌者は脳出血のリスクが約4倍に高まる可能性も示されたほか、これらの特殊な細菌は潰瘍性大腸炎を悪化させる可能性があることも明らかとなった。さらにこれらの局所的な感染が全身の免疫系の異常を引き起こし、重度全身疾患を悪化させる可能性があることも明らかにした。その一方で我々はこれまでの一連の研究から、脳卒中や潰瘍性大腸炎といった重度全身疾患を誘発する局所感染性の細菌にある共通した特徴を見出している。これらの特徴を基にして、高病原性局所感染性細菌の簡易検出システムの開発を進めている。これらの特殊な菌の検出は、疾患発症を予知・予防するうえで非常に意義のあるものと考えられた。研究開始当初は以上のような学術的背景があった。

2. 研究の目的

前述のような学術的背景と、これまでの一連の研究を基にして本研究では、高病原性局所感染性細菌による重度全身疾患の発症メカニズムを解明し、そのメカニズムを基にした標的分子の確定と重度全身疾患の発症の予防を目的とした研究を行うこととした。本研究ではこれまで我々が得ている知見と培ってきたノウハウを基に、口腔や鼻粘膜などの局所に感染する特定の細菌がどのようなメカニズムで免疫系の異常を引き起こし、その結果として重度全身疾患を発症させるのかを明らかにする。さらにそのそれらの特殊な細菌について、その保菌率と各種全身疾患発症との相関関係をより明らかにすることも併せて検討する。本研究の究極の目的は、

メカニズムを基に病態発症にかかわる原因分子を見つけ出し、それをターゲットとした治療薬の開発と将来の臨床応用に向けた道筋をつけることを究極の目標としている。

3. 研究の方法

病原性口腔細菌と全身疾患発症との関連性を明らかにするため、対象者唾液サンプル中における口腔細菌の解析を行った。この解析はヒトを対象とした研究であるため、島根大学医学部倫理委員会の承認を経たのち、ヘルシンキ宣言に基づいた倫理規範にそって行った。健診時の対象者、あるいは特定の疾患を発症して病院を受診している患者の唾液サンプルを採取し、特定の疾患誘発性口腔細菌の検出を行った。さらに脳卒中や難治性の炎症性腸疾患発症との関連が深いとされるコラーゲン結合タンパクを持つ細菌について検出を行った。これに加えて病態発症に重要な役割を果たしているコラーゲン結合タンパクをブロックできるペプチドの候補をいくつか見出し、それらの効果について検討を行った。

さらに採取したいくつかのサンプルを用いて、次世代シーケンサによる口腔細菌の網羅的解析を行い、健常者、各種疾患患者などについて比較検討を行った。データについては多変量解析などの統計手法を用いて有意差の有無を検討した。

4. 研究成果

健診時の対象者、あるいは特定の疾患を発症して病院を受診している患者の唾液サンプルを採取し、特定の疾患誘発性口腔細菌の検出を行った。その結果、循環器疾患や糖尿病、脂質異常症を持つ人では特定の口腔細菌の検出率が非常に高いことが明らかになった。特に糖尿病と循環器疾患を持つ対象者でこの傾向が強いことが明らかになった。その一例として、今回健診を行ったある地域では、歯周病原性細菌のうち最も病原性が高く、全身疾患は省との関連性が指摘されている *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) の保菌率と、糖尿病との間に関連性が認められた。すなわち糖尿病状態を示す指標である Hemoglobin A1c (HbA1c) が 7.0 以上の対象者（いわゆる血糖値のコントロールができていない糖尿病患者）と、7.0 未満の対象者を比べたところ、7.0 以上で *P. gingivalis* の保菌率が有意に高く ($P=0.045$)、オッズ比 2.24 という結果が認められた。この結果をわかりやすく解釈すれば、*P. gingivalis* を保菌していることにより、糖尿病状態の血糖値の適正コントロールができにくくなる可能性を示

している。さらにこの時のサンプル採取では、健診の一環で行われたものであるにもかかわらず、HbA1cが高いうえに糖尿病との診断をなされていない対象者も多く認められた点がおどろきであった。

さらに今回の検討で検出された *P. gingivalis* のタイプを線毛型から分類してみたところ、線毛型 II 型が多く認められた。以上の結果は、*P. gingivalis* の保菌が糖尿病の悪化に関連する可能性があることを示している。実際に歯周病菌と糖尿病の関連性や線毛型の差による病原性の強さはこれまでも指摘されており、これらを裏付ける結果が得られたのではないかとと思われる。

これに加えて、島根県歯科医師会の全面的な協力のもと、県下の歯科医院受診者を対象に広くサンプルを収集した解析も行った。その結果、*P. gingivalis* のタイプを線毛型から分類してみたところ、これまで報告された線毛型による 6 分類のいずれにも当てはまらない未分類 (unknown) 型がかなりの割合で検出された。これらの結果は、今回サンプルを採取した島根県においてはこれまで報告されていなかった *P. gingivalis* の亜種が存在する可能性が否定できないことを示している。この unknown 型が全く新しい線毛型を持つ菌株なのか、別の菌種なのか、どのような性状を示すのか、疾患発症に関連するのか、など、今後の更なる検討によって明らかにしていく必要があると考えられる。

さらに今回解析を行った対象サンプルからいくつかのサンプルを選び、次世代シーケンサを用いて口腔細菌の網羅的解析を行った。現在までのところ約 200 症例の解析を行ったが、残念ながら特定の口腔細菌叢が疾患発症に密接に関連するという有意な結果は得られていない。しかしながらいくつかの興味深い傾向が認められている。すなわち「属」レベルの解析において、健康な対象者



は比較的類似の口腔細菌叢のパターンを示す傾向があることが認められた (挿入図参照)。この傾向は健康な高齢者 (緑枠内、80 歳以上) でも認められている。一方で糖尿病、肝機能障害、高血圧、動脈硬化、脂質異常症などを持つ対象者の口腔細菌叢のパターンに一定の傾向は認められず、細菌叢に多様性が認められた。これらの結果は、口腔細菌叢のバランスが健康維持にとって重要であり、その乱れは口腔状態と相まって、全身疾患発症のリスクにつながるのではない

かと考えられた。今後のより詳細な検討が必要であると考えられる。

さらに消化器疾患の一つである好酸球性食道炎の患者では、コラーゲン結合タンパクを持つ細菌の検出率が高い傾向が認められた。コラーゲン結合タンパク質を発現している口腔細菌は、難治性の炎症性腸疾患発症との関連が深いことをこれまでに我々は報告している。これらのことから、コラーゲン結合タンパク発現と好酸球性食道炎発症との関連性が考えられた。病態発症については今後の更なる検討がヒト様であると考えられる。これに加えて、消化器疾患患者において薬物治療によって口腔細菌叢が劇的に変化することが明らかになった。すなわち胃潰瘍や逆流性食道炎治療の第一選択薬の一つであるプロトンポンプ阻害剤の投与により、口腔細菌叢が大きく変化する可能性が示された。これに加えて、口腔細菌叢の変化とともに腸内細菌叢の変化も引き起こされるという結果も認められた。すなわち、プロトンポンプ阻害剤使用により胃酸分泌が抑制され、その結果として腸内細菌叢の変化が引き起こされた可能性が考えられる。しかしながらプロトンポンプ阻害剤の使用により口腔細菌叢にお影響が出る可能性が示された。すなわち腸内細菌叢の変化と口腔細菌叢の変化が互いに関連しあっている可能性がある。これらの結果は、口腔腸相関が存在する可能性を示したものと考えられ、今後の更なる検討が必要であると考えられる。腸内細菌叢の劇的な変化は腸粘膜に影響を与え、その透過性を変化させる可能性がある。腸粘膜の透過性変化は様々な物質の腸粘膜から循環血中への移行を示しており、各種の全身疾患との関連性が注目される場所である。

前述のコラーゲン結合タンパクを発現する細菌であるが、これまでの研究からその様な細菌はコラーゲンを含む様々な生体成分との結合が強いいため、障害部位に集積しやすく、それゆえいくつかの全身疾患発症のリスクになる可能性がある。それゆえいくつかのペプチドを用いてコラーゲン結合を抑制できるかどうかについて検討した。この結果、コラーゲン結合を抑制するペプチドに共通した構造、すなわちアミノ酸のコンセンサスは配列が存在する可能性がしめされた。このコンセンサス配列はアミノ酸 7、あるいは 8 の非常に短い配列であり、効果的に結合を抑制できる可能性がある。今後、動物モデルや in vivo での解析を行い、治療・予防薬として応用可能になるかどうかについて検討する必要があると考えられる。

今後の研究の発展性として、本一連の研究によって現在、約 4000 症例のサンプルを集めることができた。現在、口腔細菌叢と各種全身疾患発症とのより詳細な関連性について更なる解析を進めている。今後は症例数を増やし、約 7000 症例について解析を行う予定にしている。これは島根県人口 70 万人

の1%に相当し、しかも県下全域からまんべんなく収集されていることから、鳥根県という地域全体の傾向を示す結果が得られるものと期待している。今後、これらの解析を基に、全身疾患発症につながる口腔細菌叢の確定と全身疾患発症予防に向けた取り組みにつながっていくのではないかと考えている。これに加えて本研究で明らかになった口腔腸相関と全身疾患発症との関連性、特に腸内細菌叢の変化と腸粘膜透過性亢進については、今後更なる検討を行う必要があると考えられる。すなわち局所感染と口腔粘膜、腸内細菌と腸粘膜透過性、それらの相互作用、といった要素についてさらなる検討を行うことにより、各種の全身疾患発症との関連性を解明できるのではないかと考えられる。

本研究の成果は、以下の論文発表や学会発表等に示されるように、多くの国際学術雑誌、学会発表等で報告・発表された。

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 9 件)

① Mishiro T, Oka K, Kuroki Y, Takahashi M, Tatsumi K, Saitoh T, Tobita H, Ishimura N, Sato S, Ishihara S, Sekine J, **Wada K**, Kinoshita Y. Oral microbiome alterations of healthy volunteers with proton pump inhibitor.

J. Gastroenterol. Hepatol. (査読有) 33: 1059-1066 (2018). doi: 10.1111/jgh.14040.

Kessoku T, Imajo K, Kobayashi T, Honda Y, Kato T, Ogawa Y, Tomeno W, Kato S, Higurashi T, Yoneda M, Kirikoshi H, Kubota K, Taguri M, Yamanaka T, Usuda H, **Wada K**, Saito S, Nakajima A. Efficacy, safety, and tolerability of lubiprostone for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adult patients with constipation: The LUBIPRONE, double-blind, randomised, placebo-controlled study design. Contemp. Clin. Trials (査読有) 69: 40-47 (2018). doi: 10.1016/j.cct.2018.04.002.

Ogawa Y, Honda Y, Kessoku T, Tomeno W, Imajo K, Yoneda M, Kawanaka M, Kirikoshi H, Ono M, Taguri M, Saito S, Yamanaka T, **Wada K**, Nakajima A. Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein and type 4 collagen 7S are useful markers for the diagnosis of significant fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease.

J. Gastroenterol. Hepatol. (査読有) in press

(2018). doi: 10.1111/jgh.14156.

Okamoto T, Takagi Y, Kawamoto E, Park EJ, Usuda H, **Wada K**, Shimaoka M. Reduced substrate stiffness promotes M2-like macrophage activation and enhances peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. Exp. Cell Res. (査読有) 367: 264-273 (2018). doi: 10.1016/j.yexcr.2018.04.005.

和田孝一郎, 臼田春樹. 難治性消化器疾患の治療と創薬—基礎研究のための疾患モデルと薬効評価の問題点— 日本薬理学雑誌 (査読有) 150: 183-187 (2017).

doi.org/10.1254/fpj.150.183.

Kato T, Honda Y, Kurita Y, Iwasaki A, Sato T, Kessoku T, Uchiyama S, Ogawa Y, Ohkubo H, Higurashi T, Yamanaka T, Usuda H, **Wada K**, Nakajima A.

Lubiprostone improves intestinal permeability in humans, a novel therapy for the leaky gut: A prospective randomized pilot study in healthy volunteers.

PLoS One. (査読有) 12: e0175626 (2017).

doi: 10.1371/journal.pone.0175626.

Kessoku T, Imajo K, Honda Y, Kato T, Ogawa Y, Tomeno W, Kato S, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Nagashima Y, Saito S, **Wada K**, Nakajima A.

Resveratrol ameliorates fibrosis and inflammation in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis.

Scientific Reports (査読有) 6:22251. doi: 10.1038/srep22251 (2016).

Nozaki Y, Fujita K, **Wada K**, Yoneda M, Shinohara Y, Imajo K, Ogawa Y, Kessoku T, Nakamura M, Saito S, Masaki N, Nagashima Y, Terauchi Y, Nakajima A. Deficiency of eNOS exacerbates early-stage NAFLD pathogenesis by changing fat distribution. BMC Gastroenterology (査読有) 15:177. doi: 10.1186/s12876-015-0409-9 (2015).

Imajo K, Kessoku T, Honda Y, Tomeno W, Ogawa Y, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Taguri M, Hyogo H, Sumida Y, Ono M, Eguchi Y, Inoue T, Yamanaka T, **Wada K**, Saito S, Nakajima A. Magnetic resonance imaging more accurately classifies steatosis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease than transient elastography. Gastroenterology (査読有) 150: 626-637 (2016). doi: 10.1053/j.gastro.2015.11.048..

[学会発表](計 8 件)

和田孝一郎. Leaky Gut Syndrome を誘発する要因とその全身への影響. 第二回黒潮カンファレンス(招待講演). 2017年.

臼田春樹, 新林友美, 岡本貴行, **和田孝**

一郎. Porphyromonas gingivalis の保菌は糖尿病の重症度と相関する. 第二回黒潮カンファレンス. 2017年.

和田孝一郎. Leaky Gut Syndrome を誘発する要因とその全身疾患への進展—薬物・腸内細菌・血流を中心として—. 大阪臨床薬理研究会(招待講演)2017年.

和田孝一郎. 我々の健康に影響を与える口腔内細菌と腸内細菌—健康長寿のカギは我々が持っている細菌がにぎっているのか?—. 医療・健康・福祉—工学技術連携可能性懇話会(招待講演). 2017年.

和田孝一郎. 口腔細菌が関連する循環器疾患. 第39回日本高血圧学会総会 シンポジウム(招待講演)2016年.

和田孝一郎. 薬力学の知識とドラッグデリバリーシステム: 薬力学の理論と臨床応用. 第30回日本耳鼻科咽喉科学会専門医講習会(教育講演). 2016年.

和田孝一郎. 健康に影響を与える腸内細菌と口腔細菌. 第60回島根県保険医協会講演会(招待講演)2016年.

和田孝一郎, 臼田春樹. Therapeutic strategies for intractable digestive diseases. 第89回日本薬理学会年会(シンポジウム)2016年.

〔図書〕(計 2 件)

和田孝一郎 (木下芳一 編). 中山書店. プリンシプル消化器疾患の臨床 「食道・胃・十二指腸の診療アップデート」. 2017年. 317-320.

和田孝一郎, 結束貴臣, ほか(落合邦康監修). 腸内細菌・口腔細菌と全身疾患. シーエムシー出版. 2015年. 259.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 腸粘膜の透過性の診断薬、診断方法、診断装置

発明者: 和田孝一郎、ほか

権利者: 島根大学

種類: 特許(特願)

番号: PCT/JP2018/001266

出願年月日: 2017年

国内外の別: 国内・国外

〔その他〕

ホームページ等

口腔内細菌と全身疾患との関連

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/pharmacology/kenkyuusyokai-oralbiome.html>

島根大学 地域包括ケア教育研究センター

<http://www.cohre.jp/research/217>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 孝一郎 (WADA, Koichiro)

島根大学・医学部・教授

研究者番号: 90263467

(2) 研究分担者

中島 淳 (NAKAJIMA, Atsushi)

横浜市立大学・大学病院・教授

研究者番号: 30326037

今城 健人 (IMAJO, Kento)

横浜市立大学・大学病院・助教

研究者番号: 30600192

田中 徹也 (TANAKA, Tetsuya)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 10346380

立花 雅史 (Tachibana, Masashi)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号: 80513449