

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15774

研究課題名(和文) 口腔マイクロバイオームと頭頸部・消化器がんの関連性の探究

研究課題名(英文) Research for relationship between oral microbiome and head and neck and digestive organ cancers

研究代表者

山下 喜久 (Yamashita, Yoshihisa)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：20192403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では頭頸部・消化器がんに関わる口腔マイクロバイオームの探索を行った。国立病院機構九州がんセンターにおいて頭頸部がんあるいは消化器がんと診断された患者から唾液を採取し、次世代シーケンサーによる網羅的細菌群集解析法を用いて各検体中の微生物の全体構成を明らかにした。久山町住民健診の2000名を超える住民の唾液から得られた一般住民の唾液マイクロバイオームの細菌構成とがん患者のものを比較してがん患者に特有の微生物種ないし構成パターンの特定を目指した。その結果、頭頸部・消化器がんの患者特有の唾液細菌叢は認められなかったが、一部の細菌種にがん患者と一般住民とのあいだで構成比率が異なっていた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is the characterization of the oral microbiome related to head and neck, digestive organ cancer. Saliva was collected from the patients who had a diagnosis of head and neck cancer or a digestive organ cancer in National Hospital Organization Kyushu Cancer Center. Salivary microbiome was analyzed with the next-generation sequencer. The results were compared with those of the salivary microbiome of dwelling population at Hisayama town to aim the identification of a special microbe or the unique constitution pattern to cancer patients. As a result, the salivary microbiome constitution peculiar to the patients of head and neck, digestive organ cancer was not recognized, but the constituent ratio of some bacterial species was significantly different between a cancer patients and non-cancer dwelling population.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：歯学 細菌 口腔マイクロバイオーム 頭頸部がん 消化器がん

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの体表面には自身の細胞数の 10 倍を超える微生物が生息しており、複雑な生態系を構築し生息している。近年、オミクス解析手法の発展によりその全体像が明らかとなり、これら常在微生物群 (マイクロバイーム) の活動が宿主の健康維持に極めて重要な役割を担っていることが明らかとなった。

我が国の死因の第一位であるがんについても常在マイクロバイームの関与が数多く指摘されている。特に胃・腸管においては *Helicobacter pylori* のような単一の関連菌に加え、腸管マイクロバイーム全体のバランスの変化 (ディスバイオーシス) が慢性炎症を助長することでがんの発症に寄与することが報告されている。一方で腸管とならび複雑な口腔常在マイクロバイームについてはがん発症との関連について不明なままである。とはいえ口腔細菌がアセトアルデヒドの産生を介して咽頭がんの発症に寄与しているとの指摘もあり、口腔微生物が近接部位のがん発症に関与している可能性は十分に考えられる。

### 2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では頭頸部および消化器がんに関わる口腔マイクロバイームの探索を行った。国立病院機構九州がんセンターにおいて頭頸部がんないし消化器がんと診断された患者から唾液を採取し、次世代シーケンサーを用いた網羅的細菌群集解析法を用いて各検体に含まれる微生物の全体構成を明らかにした。我々は以前の研究において福岡県糟屋郡久山町において住民健診の際に 2000 名を超える住民の唾液を採取しており、これを分析することで得られた日本の一般住民の唾液マイクロバイームの細菌構成とがん患者のものを比較することでがん患者に特有の微生物種ないし構成パターンの特定を目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では国立病院機構九州がんセンターにおいて頭頸部がんないし消化器がんと診断された患者に対して研究内容を説明し、研究参加に対する同意が得たのち研究を開始した。研究計画については九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会および国立病院機構九州がんセンターにおける倫理審査委員会において実施許可を受けた。

(1) 口腔診査、全身状態に関する情報の取得、および唾液検体の採取

対象者に口腔の健康に関わる生活習慣についてのアンケートを記載してもらったのち、歯式および歯周組織の状態に関する口腔診査を行った。さらにカルテよりがんの部位およびステージとグレード、臨床所見 (年齢、性別、体重、病歴に関する情報)、既往歴、服薬状況に関する情報を取得した。唾液はガ

ムを 2 分間咀嚼した際に得られる刺激唾液を採取した。採取した唾液は九州がんセンター内の冷凍庫にて保管し、適宜氷上にて九州大学歯学研究院口腔予防医学分野に移送した。九州大学にて 500 $\mu$ l の唾液を遠心分離し得られた沈殿から微生物群集 DNA の取得を行った。

得られた各検体由来の DNA を鋳型として PCR 法を用いて細菌 16S rRNA 遺伝子 V1-V2 領域を網羅的に増幅した。プライマーにはシーケンス用のアダプター配列を付与した 338R プライマーと、アダプター配列に加え 8 塩基の検体識別用タグ配列を付与した 8F プライマーを用いた。異なるタグ配列を持つ 16S rRNA 遺伝子群を等濃度ずつ混合し、これを鋳型として Ion PGM Hi-Q OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いてエマルジョン PCR を行い、シーケンス用の鋳型 DNA を作製した。これを Ion PGM Hi-Q View Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて次世代シーケンサー Ion PGM (Thermo Fisher Scientific 社) にて塩基配列の解読を行った。

得られた塩基配列は断片長、クオリティスコア、プライマー配列の有無、ホモポリマーの有無に基づくクオリティチェックを行い、低品質のリードを除去したのち、タグ配列の情報に基づき全リードを各検体への割り振りを行った。既に福岡県糟屋郡久山町の住民から採取した唾液由来の塩基配列と混合したのち、UPARSE を用いて Operational taxonomic unit (OTU, 解析操作上の菌種) に分類し、検出 OTU 数をはじめとする alpha diversity を算出した。各 OTU の代表配列は RDP Classifier を用いて菌属レベルまで特定するとともに、Human Oral Microbiome Database に登録されている塩基配列に対する相同性検索を行い、該当する菌種を推定した。各 OTU に該当するリード数を算出し、各菌門、菌属、菌種の構成比率を決定した。また全検体間に対して細菌群集構成類似度指標 UniFrac を算出し、両群の細菌構成の差異の有無について検討を行った。

### 4. 研究成果

本研究では 71 名の頭頸部ないし消化器がん患者から唾液を採取し、細菌構成の解析を行った。うち男性が 50 名、平均年齢は 66.6 $\pm$ 10.1 歳 (38-84 歳) であった。がんの原発部位としては直腸がん (12 名)、食道がん (11 名)、咽頭・喉頭がん (10 名)、胃がん (10 名)、舌がん (4 名) 等であった。

対象者の唾液からは 816 の OTU (菌種レベル) が検出され、口腔常在細菌として知られる *Streptococcus*、*Neisseria*、*Prevotella*、*Rothia*、*Actinomyces*、*Veillonella*、*Porphyromonas* といった細菌属が高い割合を占めていた。本がん患者群の唾液中の細菌構成の全体像に久山町の成人住民 2286 名と比べて差異があるか否か明らかにするため、各検体間の細菌構成

類似度指標 UniFrac を算出し、主座標分析の手法を用いて可視化したのが図1である。赤い点としてプロットされたがん患者群はグレーでプロットされた一般住民群と同様、プロット上に偏りなく存在しており、がん患者の唾液細菌叢が独特な構成を呈しているわけではないことが示唆された。

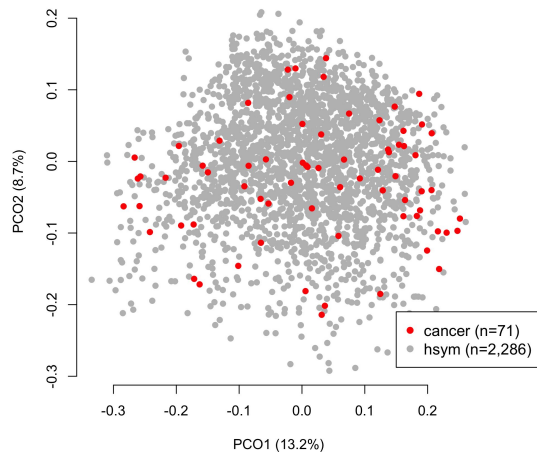


図1 がん患者と一般住民の細菌構成の類似度関係

細菌構成の複雑さを示す alpha diversity について両群を比較してみると、検出菌種数には有意な差は認められなかったが、存在する菌種の系統的幅を評価する phylogenetic diversity はがん患者群のほうが有意に高かった。一般住民と比べがん患者の口腔には多様な細菌種が存在していることが示唆された。

表1 がん患者と一般住民の細菌構成の複雑さの違い

|                         | がん患者群<br>(n=71) | 一般住民群<br>(n=2286) | P value |
|-------------------------|-----------------|-------------------|---------|
| 検出OTU数                  | 177.3 ± 53.8    | 179.1 ± 36.8      | 0.764   |
| Phylogenetic diversity  | 11.3 ± 2.7      | 10.9 ± 1.7        | 0.048   |
| Shannon diversity index | 3.5 ± 0.4       | 3.4 ± 0.2         | 0.038   |

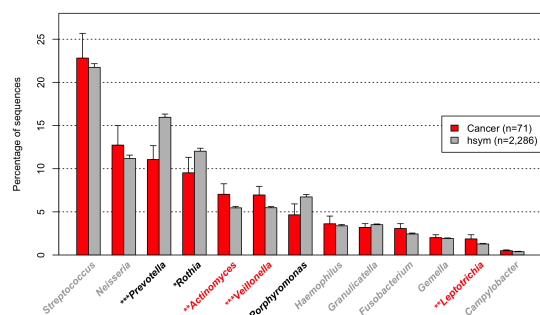


図2 両群における主要な各細菌属の構成比率 (赤、がん患者、灰、一般住民)

さらに、がん患者に特徴的な細菌を探索するため、個々の細菌の構成比率の比較を行った。両群の主要な細菌属の構成比率を示したのが図2である。いずれの群においても *Streptococcus* や *Neisseria* をはじめとする細菌属が高い割合を占めていた。一方で一部の細

菌属の構成比率には二群間で有意な差が認められ、がん患者群では *Actinomyces*、*Veillonella*、*Leptotrichia* の構成比率が高く、*Prevotella*、*Rothia*、*Porphyromonas* の構成比率が低かった。

さらに菌種レベルで両群に差異のある細菌を抽出するため、各 OTU の検出リード数に基づいて Linear Discriminant Analysis Effect Size (LEFSe) 解析を行った。がん患者群に最も特徴的な OTU は *Porphyromonas gingivalis* に該当するものであり、その他 *Veillonella atypica*、*Streptococcus* sp. OT-74 等もがん患者に特徴的に検出された。口腔および咽頭がんに限定した場合も、特徴的な菌種として *Porphyromonas gingivalis* が抽出された。*P. gingivalis* に該当する OTU33 の構成比率が5%を超える高い割合を占める者は一般住民では8名と全体の0.3%に過ぎないのに対し、がん患者群では8.4% (6名) を占めていた。6名のうち4名の口腔には6mmを超える深い歯周ポケットが認められており、単に歯周炎の状態を反映している可能性は否めないが、本菌ががん患者の口腔となんらかの関連がある可能性が示唆された。

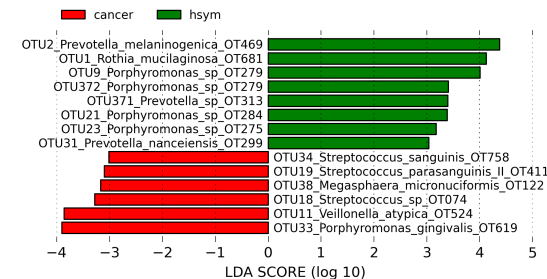


図3 がん患者 (赤) と一般住民 (緑) の識別に有用な OTU

LDA スコアが3を超えるもののみを示した。

本研究では、頭頸部ないし消化器がんの患者特有の唾液細菌叢の存在は認められなかったが、一部の細菌種にがん患者と一般住民とのあいだで構成比率が異なることが明らかとなった。今後、これらの菌とがん発症との関連を検討していくことで、新たながん発症予防アプローチの構築につながっていくものと考えられる。

### 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9件)

1. 山下喜久, 口腔マイクロバイオームとう蝕。ザ・クインテッセンス 36:84-89, 2017.
2. Kageyama S, Takehita T, Asakawa M, Shibata Y, Takeuchi K, Yamanaka W, Yamashita Y. Relative abundance of total subgingival plaque-specific bacteria in salivary microbiota reflects the overall periodontal condition in patients with periodontitis. PLoS One 12(4): e0174782, 2017.

3. 山下喜久. 加齢と口腔マイクロバイオームの変化. 日本アンチエイジング歯科学会誌 9:126-131, 2016.
4. 竹下徹, 山下喜久. 口腔常在微生物叢の構成と健康との関連. 日本乳酸菌学会誌 27:3-9, 2016.
5. Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, Tsuboi H, Takeuchi K, Shibata Y, Shimazaki Y, Akifusa S, Ninomiya T, Kiyohara Y, Yamashita Y. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study. Sci Rep 6:22164, 2016.
6. 山下喜久, 竹下徹. 口腔マイクロバイオーム評価の臨床的意義. 臨床化学 44:290-297, 2015.
7. 山下喜久, 竹下徹. 口腔マイクロバイオーム. 臨床と微生物 42:711-715, 2015.
8. 古田美智子, 山下喜久. 誤嚥性肺炎予防における口腔ケアの有効性. 臨床と研究 92:1575-1580, 2015.
9. Takeshita T, Yasui M, Shibata Y, Furuta M, Saeki Y, Eshima N, Yamashita Y. Dental plaque development on a hydroxyapatite disk in young adults observed by using a barcoded pyrosequencing approach. Sci Rep 5:8136, 2015.

[学会発表](計 24 件)

1. 山下喜久. 口腔マイクロバイオームをめぐる最近の話題. 第 57 回日本呼吸器学会. 東京都東京フォーラム, Apr 22, 2017.
2. Yamashita Y. Diagnostic value of salivary microbiome to grasp periodontal health condition and susceptibility to periodontal disease. 3rd Microbiome R&D and Business Collaboration Congress: Asia. Hong Kong, Mar 2, 2017.
3. Takeshita T, Kageyama S., Asakawa M, Furuta M, Takeuchi K, Ninomiya T, Yamashita Y. Characteristics of salivary microbiome in orally-healthy Japanese adults. 第 90 回日本細菌学会総会. 仙台市, Mar 20, 2017.
4. 影山伸哉, 竹下徹, 朝川美加李, 柴田幸江, 松見理恵, 古田美智子, 竹内研時, 山下喜久. 唾液マイクロバイオームにおける IgA 結合細菌の探索. 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会. 東京, Mar 3, 2017.
5. Kageyama S, Takeshita T, Asakawa M, Shibata Y, Matusmi R, Furuta M, Takeuchi K, Yamashita Y. Exploration of IgA-binding bacteria in salivary microbiome. Kyudai Oral Bioscience 2017. Fukuoka, Feb 11, 2017.
6. Kageyama S, Takeshita T, Asakawa M, Shibata Y, Matusmi R, Furuta M, Takeuchi K, Yamashita Y. Identification of IgA-binding bacteria in salivary microbiome. 6th International Human Microbiome Congress, Houston, Nov 10, 2016.
7. Takeshita T, Kageyama S, Asakawa M, Furuta M, Takeuchi K, Ninomiya T, Yamashita Y. Identification of salivary microbiome in orally-healthy Japanese adults. 6th International Human Microbiome Congress. Houston, Nov 10, 2016.
8. 山下喜久. 口腔バイオフィルムの網羅的解析から見える次世代の歯科医療. 第 23 回日本歯科医学総会. 福岡市福岡国際会議場, Oct 22, 2016.
9. Yamashita Y, Takeshita Y, Furuta M, Takeuchi K, Shibata Y, Ninomiya T. Characteristics of bacterial composition in saliva of edentulous adults. 4th World Congress on Targeting Microbiota. Paris, Oct 17, 2016.
10. 山下喜久. 口腔マイクロバイオームと口腔疾患. 日本ヘルスケア歯科学会ヘルスケアミーティング 2016. 東京, Oct 10, 2016.
11. 影山伸哉, 竹下徹, 朝川美加李, 柴田幸江, 山下喜久. 唾液マイクロバイオームは歯周病の重症度を反映する. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会. 札幌, Aug 25, 2016.
12. Asakawa M, Takeshita T, Kageyama S, Yamashita Y. Development of oral indigenous microbiota and factors associated with maturation in early childhood. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会. 札幌, Aug 25, 2016.
13. Takeshita T, Asakawa M, Kageyama S, Yamashita Y. Succession of tongue microbiota in early childhood and its related factors. ISME 16. Aug 24, 2016.
14. Yamashita Y. Oral microbiota representing oral health conditions and host susceptibility to periodontitis. 2016 IADR/APR General Session & Exhibition. Seoul, Jun 24, 2016.
15. 山下喜久. 口腔マイクロバイオームの評価に基づく健康管理. 第 16 回日本抗加齢医学会総会. 横浜市パシフィコ横浜, Jun 11, 2016.
16. 山下喜久. 加齢と口腔マイクロバイオームの変化. 第 11 回日本アンチエイジング歯科学会学術大会, 福岡市未来ホール, May 21, 2016.
17. 山下喜久. 歯科からみた呼吸器感染症. 第 46 回日本嫌気性菌感染症学会. 長崎市長崎大学良順会館, Mar 5, 2016.
18. 竹下徹. Ion PGMシステムを用いた大規模メタ16S解析による健康に関わる口腔マイクロバイオームの探索. Applied Biosystems / Ion Torrent ユーザーグループミーティング. 東京 品川シーズンテラスカンファレンス, Dec 11, 2015.

19. 竹下徹. 疾患および健康に関連する口腔常在マイクロバイオームの探索. 日本乳酸菌学会秋季セミナー. 東京都昭和女子大講堂, Nov 27, 2015.
20. 影山伸哉, 竹内研時, 泉繭依, 我那覇生純, 竹下徹, 柴田幸江, 古田美智子, 山下喜久. ADLの低下した無歯顎高齢者の口腔マイクロバイオーム. 第9回細菌学若手コロッセウム. 鹿児島市レインボー桜島, Nov 24, 2015.
21. Takeshita T, Yamashita Y. Salivary microbiome and environmental conditions in the oral cavity. 第63回国際歯科研究学会JADR. 福岡市福岡国際会議場, Oct 31, 2015.
22. Takeshita T, Yamashita Y. A molecular epidemiology study exploring oral microbiome structure associated with human health.新潟市朱鷺メッセ, Sep 11, 2015.
23. 影山伸哉, 竹内研時, 泉繭依, 我那覇生純, 竹下徹, 柴田幸江, 古田美智子, 山下喜久. 歯の有無が口腔常在細菌叢に与える影響. 第37回九州口腔衛生学会・総会. 長崎市長崎県歯科医師会館, Sep 6, 2015.
24. 影山伸哉, 竹内研時, 泉繭依, 我那覇生純, 竹下徹, 柴田幸江, 古田美智子, 山下喜久. 生活機能の低下が口腔常在細菌叢に与える影響. 第64回日本口腔衛生学会・総会. つくば市つくば国際会議場, May 28, 2015.

〔図書〕(計2件)

1. 山下喜久, 竹下徹. 第1章第1節口腔マイクロバイオームと口腔疾患: ヒトマイクロバイオーム研究最前線 (監修: 服部正平) 株式会社エヌ・ティー・エス, 2016.
2. 山下喜久, 竹下徹. 舌苔細菌叢のメタ解析: 実験医学別冊 NGS アプリケーション メタゲノム解析 実験プロトコール (編集: 服部正平) 羊土社, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

1. 名称: 齲蝕に関連する口腔内細菌の特定方法  
 発明者: 山下喜久、竹下徹、安井雅樹、佐伯洋二  
 権利者: 株式会社ロツテ、国立大学法人九州大学  
 種類: 特願  
 番号: 2015-131143  
 出願年月日: 2015年6月3日  
 国内外の別: 国内

取得状況 (計 件)

名称:  
 発明者:

権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:

〔その他〕  
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下喜久 (YAMASHITA, Yoshihisa)  
 九州大学・大学院歯学研究院・教授  
 研究者番号: 20192403

(2) 研究分担者

竹内研時 (TAKEUCHI, Kenji)  
 九州大学・大学院歯学研究院・助教  
 研究者番号: 10712680

竹下徹 (TAKESHITA, Toru)  
 九州大学・大学院歯学研究院・准教授  
 研究者番号: 50546471

(3) 連携研究者

藤也寸志 (TOU Yasushi)  
 独立行政法人国立病院機構 (九州がんセンター臨床研究センター)・副病院長  
 研究者番号: 20217459

森田勝 (MORITA Masaru)  
 独立行政法人国立病院機構 (九州がんセンター臨床研究センター)・消化器外科科長  
 研究者番号: 30294937

益田宗幸 (MASUDA Muneyuki)  
 独立行政法人国立病院機構 (九州がんセンター臨床研究センター)・頭頸部外科科長  
 研究者番号: 90284504