

令和元年6月12日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11865

研究課題名(和文)川崎病と口腔由来細菌の関連性に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Basic study on the relationship between Kawasaki Disease and oral microbiota

研究代表者

喜多 正和(Kita, Masakazu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：60153087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病は乳幼児に好発する冠動脈瘤を合併する全身性汎血管炎である。その発症メカニズムは未だに不明であるが、病原因子に対する免疫応答が関与していることが示唆されている。本研究では、川崎病患者の口腔細菌叢のメタゲノム解析により、病態と関連する口腔細菌を同定することを目的とした。その結果、ヘモフィルス属菌とTM7が川崎病と健常者の口腔細菌叢で異なっており、一部の口腔細菌叢が減少していることから、口腔細菌叢のdysbiosisと考えられた。従来、dysbiosisにより免疫系のバランスが崩れ、多様な免疫疾患が発症することが推測されており、同様の機構が川崎病の病態形成に関与しているものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

川崎病は現在でも小児の後天性心疾患の原因としてトップに位置しており、第24回川崎病全国調査では、2015年に患者数が過去最高を更新している。また、川崎病は心筋梗塞等の合併症を引き起こし、死に至ることもあるため、我が国の少子高齢化現象のなかで大きな問題となっている。本研究により川崎病の起炎菌が明らかになれば、それに有効な予防法・治療法の開発へとつながるため社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Kawasaki disease (KD) is a childhood vasculitis often associated with cardiovascular complications, including coronary artery aneurysms. Although its etiologic mechanisms are unknown, several studies indicate that dysregulated innate immune responses to external and internal microorganisms may be involved in the pathogenesis. The purpose of this study is to analyze dental microbiota of KD patients by metagenomic analysis, and identify specific microbiota in relation to the pathogenesis of acute-phase KD. In random forest analysis, Haemophilus spp. and TM7 were detected as bacterial species which could distinguish KD patients from healthy controls. Our studies revealed that a few microbiota was significantly decreased in KD patients, and this phenomenon is seems to be microbial dysbiosis. It has been speculated that dysbiosis would disrupt the balance of immune system, and trigger the onset of various immune diseases. Similar mechanism could be involved in the pathogenesis of KD.

研究分野：社会系歯学

キーワード：川崎病 口腔細菌 免疫学 社会医学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

川崎病は、乳幼児期に好発する原因不明の全身性汎血管炎である。川崎病は心筋梗塞等の合併症を引き起こし、時には死に至ることもあるため、我が国の少子化現象のなかで大きな問題となっている。川崎病の発症メカニズムは長らく不明であるが、季節性で流行することから、その発症にはある種の細菌やウイルスなど病原体の感染が関連していると推測される。川崎病は、現在でも小児の後天性心疾患の原因としてトップに位置しており、2014年の第23回川崎病全国調査では、患者数が1万5979人と過去最高を更新している。我々は、川崎病が高熱、発疹、口腔内の発赤（咽頭発赤とイチゴ舌）を主症状とするため、口腔を介し感染が成立すると考えた。*Actinobacillus actinomycetemcomitans* や *Porphyromonas gingivalis* などの歯周病菌は、感染性心内膜炎や閉塞性血栓性血管炎を引き起こすことから、口腔内フローラのDysbiosis（バランス失調）が宿主の免疫を攪乱し、川崎病を引き起こす可能性がある。

本研究は、歯周病菌投与により、新規川崎病マウスモデルの作成を行う。さらに、川崎病患者のデンタルプラークを採取し、口腔フローラの構成細菌の変化を次世代シーケンサーで調べ、起炎菌の探索を行う。

2. 研究の目的

申請者は、川崎病は口腔内症状を認めることから、口腔内細菌フローラのバランスの変化により発症すると考えた。カリフォルニア大学サンディエゴ校と自治医科大学の国際研究グループは、川崎病は、中国北東部を発生源とするカンジダ菌が関与している可能性があるとして報告した（Rodó X et al. PNAS, 2014）。その理由として、日本で大流行した時期、大陸からの季節風の時期に完全な一致があると報告した。さらに、この原因として中国の北東部での農業慣習などにより、土壌中の細菌叢の変化によるものと推測している。しかしながら、インドやフィリピンで発症している川崎病は、これでは説明がつかないため、カンジダは原因の候補という段階に留まっている。我々は、カンジダ以外の口腔内細菌として、*A.actinomycetemcomitans* *actinomycetemcomitans*（以下 A.a）に注目した。A.aは、若年性歯周炎の原因菌であり、NOD1リガンドを大量に産生することが知られている（Jiao et al. Cell Host and Microbe 2013）（Thay B et al. Infection and Immunity 2014）。また、NOD1の投与により、川崎病様の病態を呈する動物モデルが作成できることから、NOD1リガンドを大量に産生するA.aを投与することで、川崎病様の病態ができると考えた。また、川崎病患者と健常児のA.aを含む歯周病菌を次世代シーケンサーで網羅的に調べ、比較することで、起炎菌が同定できると考えた。

本研究では、若年性歯周炎の原因菌であるA.a投与による川崎病モデルマウスの作成をおこなうと同時に川崎病患者のデンタルプラークを採取し、口腔フローラの細菌の割合の変化を16srRNAメタゲノムで網羅的に解析することで、その発症に關与する細菌を探索する。本研究の目的は、長らく不明であった川崎病の原因菌と発症メカニズムを明らかにし、その治療法や予防法の開発につなげる。



(写真)口唇の紅潮といちご舌

川崎病学会ホームページより

3. 研究の方法

1) 川崎病モデルの作成

マウス (DBA/2, C57BL/6J, CBA/N) にカンジダ菌抽出物を投与することで、川崎病類似血管炎発症が報告されている。このことから、川崎病は病原体の感染や病原微生物に関連した外因性の物質 (Pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) により引き起こされると考えられる。歯周病菌 (A.a や *P. gingivalis* : 以下 P.g) は、感染性心内膜炎や閉塞性血栓性血管炎等の血管炎を引き起こすことから、川崎病の発症にも関与していると考えた。

A.a 菌は ATCC 43718 株 (Y4) を用いた。ATCC のプロトコールに従い Brain Heart infusion medium にて 34°C, 5%CO₂ で 3 日間培養したのち、菌体を回収し生理食塩水で洗浄しマウス尾静脈内にマウス 1 匹あたり 1.2x10⁶CFU/100μl を単回投与した (n=4)。対照群マウスには生理食塩水を同量投与した。マウスは、すでに報告されている A.a 菌由来 LPS に対する感受性の系統差を考慮して 6 系統のマウス (DBA/2, Balb/c, C57BL/6, C3H, B10BR, B10S, 雄 6~7 週齢) を用いた。投与から 7 日目に安楽死させ、PBS にて臓器を還流後、心臓および血清を採取した。動物実験は本学実験動物センター感染実験室 (SPF 環境) にて実施した。心臓は 4% 中性緩衝ホルマリンにて固定し、シュウクロース溶液で処理したのち、OTC に包埋して凍結した。凍結切片はヘマトキシリン-エオジン (HE) にて染色した。

2) メタゲノム解析

本研究内容は、本学倫理委員会に申請し、承認を得た (決定通知番号 ERB-C-542-1)。また、川崎病は地域性があるため、京都府内だけではなく、他県 (岡山県) においてもサンプル採取を行った。0 歳から 6 歳の川崎病患者 (n=5)、健常人 (n=6) よりデンタルプラークを採取した。採取するタイミングは朝の起床時 (朝食前、歯磨き前) に行った。被験歯の周囲を手用スクレーパー (滅菌済み) で被験歯の近心唇側面および近心頬側面から採取した。採取したデンタルプラークは 10μl の Nuclease-Free Water で懸濁した。プラーク検体を 0.1mm ジルコニアビーズにより破碎し、UCP Pathogen kit (Qiagen) の標準プロトコールにより DNA を抽出した。ゲノム DNA は LabChip Genome kit (PerkinElmer) を用いて電気泳動で確認した。1stPCR で 16S rDNA の V3-V4 領域を増幅し、目的サイズの DNA バンドを確認した (図 1)。16S rDNA の V3-V4 領域は次世代シーケンサー (MiSeq, イルミナ社) を用いてメタゲノム解析を行った。

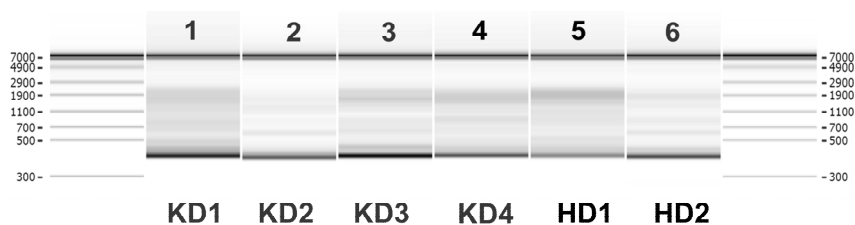


図1 ↑1stPCRの結果。1~4レーン川崎病患者(KD)、5・6は健常児(HD)。

4. 研究成果

1) 川崎病モデルの作成

6 系統のマウス (DBA/2, Balb/c, C57BL/6, C3H, B10BR, B10S) に A.a 菌を感染させ心臓および血管における病態形成の有無を検討した結果、一部に心筋内への軽度の細胞浸潤像を認める個体があったものの、投与した 6 系統すべてにおいて明らかな冠動脈炎および大動脈炎を

発症した個体はみられなかった。また、全ての系統の A.a 菌投与群で死亡個体は認められず、A.a 菌感染はマウスの生存に影響しなかった。

メタゲノム解析

川崎病患者のデンタルプラークに含まれる細菌属の構成比率を示す(図2)。川崎病児(KD)と健常児(HD)の口腔細菌叢を比較した結果、ランダムフォレスト解析により、ヘモフィルス属菌と TM7 が川崎病と健常者の口腔細菌叢で異なっていた。本研究により、川崎病患者の一部の口腔細菌叢が減少していることが明らかとなり、口腔細菌叢の dysbiosis と考えられた。従来から、dysbiosis により免疫系のバランスが崩れ、多様な免疫疾患が発症することが推測されていることから、同様の機構が川崎病の病態形成に関与しているものと考えられる。しかしながら、川崎病発症に関連する口腔細菌叢を証明するためには、今後より多くの症例を用いて検討する必要がある。

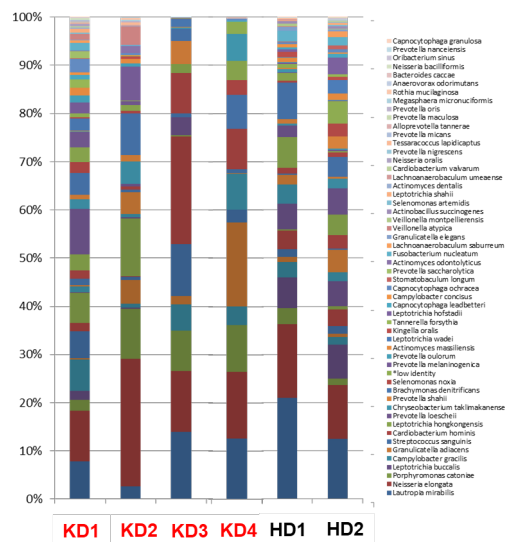


図2 メタゲノム解析の結果

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 6 件)

川崎病患者歯垢検体を用いた急性期病態における dysbiosis に関する研究. 池田和幸, 岡本亜希子・濱岡秀樹・足立哲也・鈴木千夏・八幡倫代・中村明宏・谷口誠・山本俊郎, 喜多正和・金村成智・濱岡建城. 第37回(公社)日本川崎病学会・学術集会, 東京, 東京大学, 2017/10/28.

川崎病患者デンタルプラークを用いた急性期病態における dysbiosis に関する研究. 濱岡秀樹・池田和幸・足立哲也・山本俊郎・谷口誠・岡本亜希子・濱岡建城・金村成智. 第61回(特非)春季日本歯周病学会学術大会, 東京, 東京大学, 2017/6/1.

Characterization of the dental microbiota of Kawasaki disease by metagenomics analysis. Ikeda K, Okamoto-Hamaoka A, Hamaoka H, Tetsuya A, Yahata T, Suzuki C, Taniguchi M, Yamamoto T, Kanamura N, Hamaoka K. The 12th international Kawasaki disease symposium, Yokohama, Japan, Jun 13, 2018. (国際学会)

川崎病発症原因菌としての口腔内バイオフィルム細菌に関するメタゲノム解析. 濱岡秀樹・池田和幸・足立哲也・山本俊郎・谷口誠・岡本亜希子・濱岡建城・金村成智. 第148回(特非)日本歯科保存学会2018年度春季大会, 横浜, 横浜みなとみらいホール, 2018/6/15.

川崎病患者歯垢検体を用いた口腔内バイオフィルム研究. 池田和幸・濱岡秀樹・岡本亜希子・足立哲也・鈴木千夏・八幡倫代・中村明宏・山本俊郎・金村成智・濱岡建城. 第38回(公社)日本川崎病学会・学術集会, 和歌山, 和歌山県民文化会館, 2018/11/16.

メタゲノム解析を用いた川崎病患者口腔内バイオフィルム研究. 池田和幸・濱岡秀樹・岡本亜希子・足立哲也・鈴木千夏・八幡倫代・中村明宏・山本俊郎・金村成智・濱岡建城. 第 55 回 (特非) 日本小児循環器学会総会・学術集会, 札幌, 札幌コンベンションセンター, 2019/6/27-29 (予定) .

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：金村 成智

ローマ字氏名：KANAMURA NARISATO

所属研究機関名：京都府立医科大学

部局名：医学（系）研究科（研究院）

職名：准教授

研究者番号（8桁）：70204542

研究分担者氏名：山本 俊郎

ローマ字氏名：YAMAMOTO TOSHIRO

所属研究機関名：京都府立医科大学

部局名：医学（系）研究科（研究院）

職名：講師

研究者番号（8桁）：40347472

研究分担者氏名：池田 和幸

ローマ字氏名：IKEDA KAZUYUKI

所属研究機関名：京都府立医科大学

部局名：医学（系）研究科（研究院）

職名：助教

研究者番号（8桁）：30507786

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。