

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12018

研究課題名（和文）口腔細菌によるペーチェット病の発症要因の探索 - メタゲノム解析を用いて -

研究課題名（英文）Metagenomic approach in the investigation of oral microbial communities associated with the Behcet's disease

研究代表者

藤田 真理 (FUJITA, Mari)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：50405669

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：メタゲノム解析を用いて、ペーチェット病患者における口腔内細菌の関与を調べた。口腔潰瘍を有するペーチェット病患者には *Prevotella histicola*、*Bifidobacterium dentium*、が多く検出されるという報告があるが、本研究では属レベルの大きな差はなく、健常者との細菌種の数の有意差もなかった。同様にサルコイドーシス患者、Vogt-小柳-原田病患者についても細菌種の数や属レベルでの大きな差はなかった。また、種多様性の検証を目的として、多様性解析を行ったが、有意差はなかった。従って、これらの疾患を有する患者と健常者の間では、唾液中の細菌叢には大きな差がないと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペーチェット病は口腔内アフタ性潰瘍、眼のぶどう膜炎、皮膚症状、外陰部潰瘍を4大主症状とする難治性炎症性全身疾患である。口腔内アフタ性潰瘍について口腔領域からアプローチする際には、口腔細菌叢や唾液など、口腔に影響を及ぼす環境因子について検証をおこなうが、本研究では口腔細菌叢の特徴的な違いは認められなかったことから、今後は細菌の代謝産物や唾液など、その他の環境因子の関与について検討を行う必要がある。また、将来的に、トルコやモンゴルなどの海外のペーチェット病患者について比較検討を行うことにより、ペーチェット病の発症要因の解明につながる新しい知見が得られるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：We explored the involvement of oral bacteria in Behcet's diseases using metagenomic analysis. In the previous study, it has been reported that *Prevotella histicola* and *Bifidobacterium dentium* are frequently detected in Behcet's disease patients with oral ulcers, but no significant difference at the genus level and in the number of bacterial species was observed in this study in comparison with healthy control. Similarly, there was no significant difference in the number of bacterial species and the genus level between patients with sarcoidosis, and Vogt-Koyanagi-Harada disease and those with healthy controls. In addition, we performed  $\alpha$ -diversity analysis to verify species diversity, but no significant difference was obtained. Therefore, it is considered that there is no significant difference in the bacterial flora in saliva between patients with these diseases and healthy subjects.

研究分野：口腔細菌

キーワード：ペーチェット病 口腔内アフタ性潰瘍 唾液 口腔細菌叢

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ペーチェット病は口腔内アフタ性潰瘍、眼のぶどう膜炎、皮膚症状、外陰部潰瘍を4大主症状とする難治性炎症性全身疾患である。ペーチェット病の原因は未だ不明のままであるが、これまでの研究により遺伝要因と環境要因が疾患発症に関連していると考えられている。現在までにブランクの初期付着に参与している連鎖球菌 *Streptococcus sanguinis* の役割が注目されてきたが、原因や機構の解明には至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究ではペーチェット病発症に先行してほぼ全例で口腔粘膜のアフタ性潰瘍が発症することに注目し、その環境要因解明のため次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析によって口腔細菌叢を調査し、疾患の原因解明に加え、将来的な予防および適切な治療法開発について検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

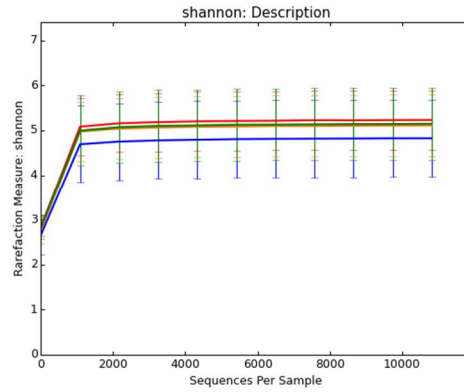
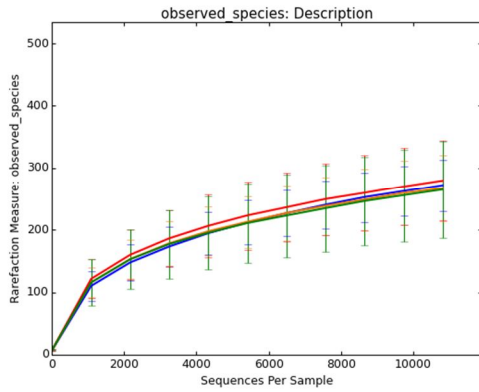
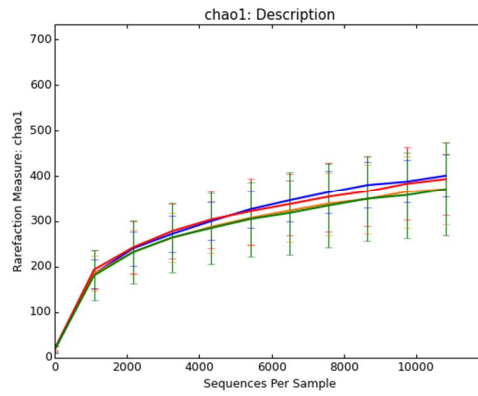
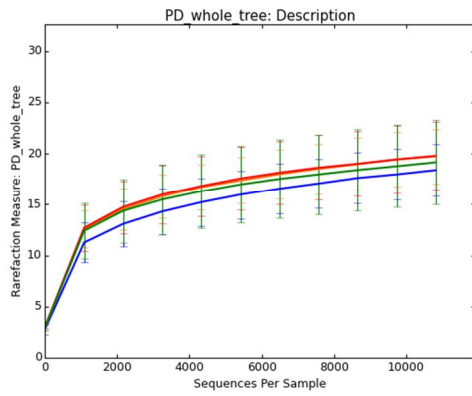
(1) ペーチェット病患者27名及び健常者30名、サルコイドーシス患者26名、Vogt-小柳原田病患者17名、計100名の唾液からDNAを抽出した。

(2) 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, CA, USA) に基づいて、16S rRNA の V3-4 領域を PCR で増幅させた後、AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter Genomic) で PCR 産物を精製した。Nextera XT Index kit v2 Set A (Illumina) を用いてサンプル DNA に Illumina シーケンサー用アダプターおよびインデックス配列を付加した。PCR 産物を AMPure XP ビーズを用いてライブラリーを精製した後、二重鎖 DNA 特異的な検出が可能な Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific) で濃度を測定した。測定した DNA 濃度は、MiSeq の最終インプット濃度 (pM) に調製するために、平均ライブラリーサイズ (PCR 産物の平均サイズ) を基に nM 単位に換算した。ライブラリー調製後、Amplicon ライブラリーと PhiX Control (Illumina) を混合した。混合した溶液を MiSeq Reagent Kit v3 (600cycles, Illumina) の MiSeq Reagent Cartridge にアプライし、シーケンスを行った。

(3) シーケンスデータの解析は、細菌叢解析ソフトウェア Quantitative Insights into Microbial Ecology 2 (QIIME2) を用いた。口腔細菌のタクソノミーは operational taxonomic units (OTUs) で評価した。多様性は、Shannon's Index、Chao1、Observed Species および PD Whole Tree index で、多様性は、Weighted unifracs distance、Unweighted unifracs distance で評価し、視覚的に比較するために、主座標分析 (PCoA) を使用した。

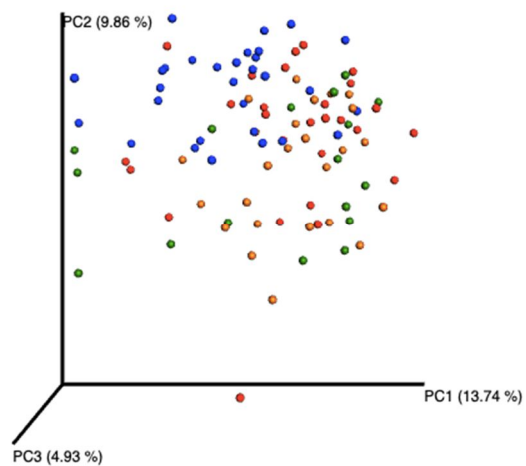
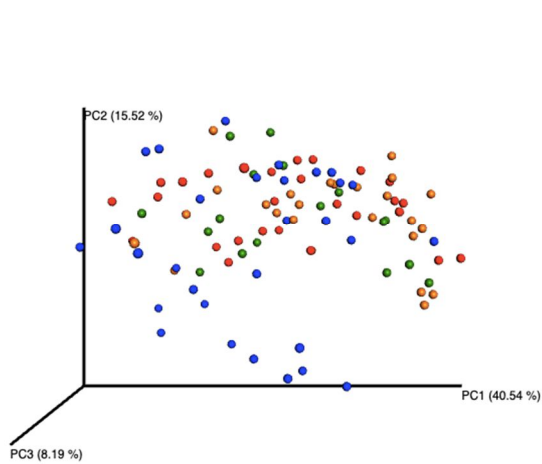
### 4. 研究成果

(1) 多様性解析



■ ベーチェット病患者 ■ 健常者 ■ サルコイドーシス患者 ■ Vogt-小柳 原田病患者  
 健常者、ベーチェット病患者、サルコイドーシス患者、Vogt-小柳-原田病患者のデータを統合し、多様性解析を行った。全てのグループの指標に統計学的な有意差は認められなかった。

## (2) 多様性解析



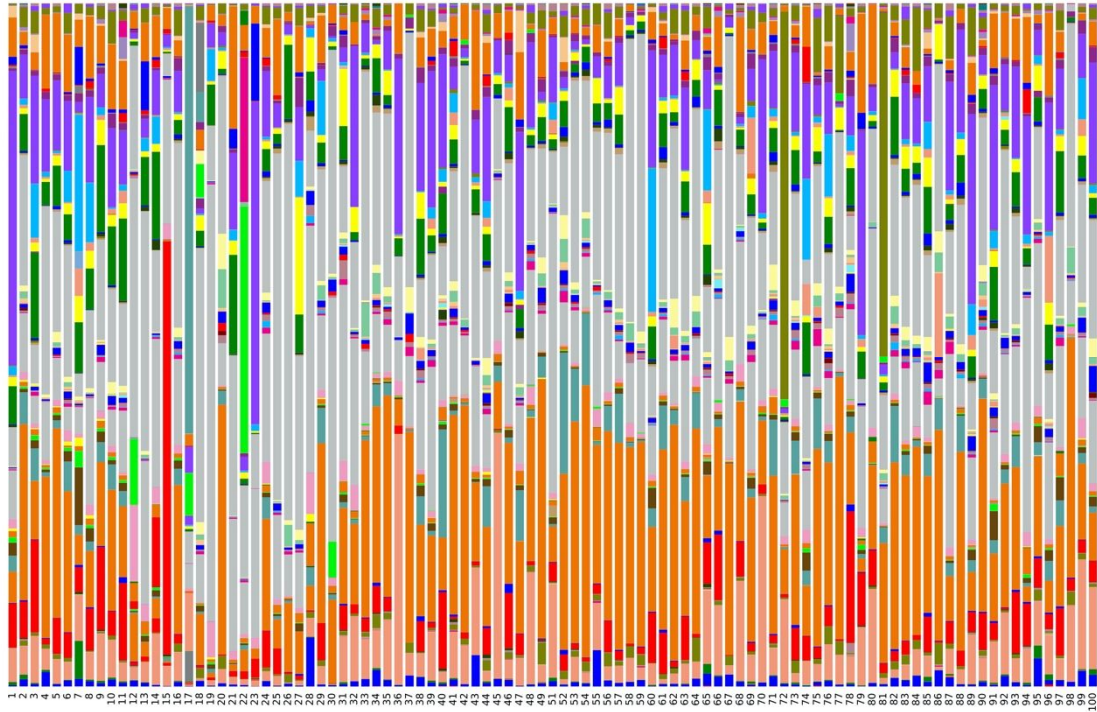
PCoA plot (weighted\_unifrac)

PCoA plot (unweighted\_unifrac)

■ ベーチェット病患者 ■ 健常者 ■ サルコイドーシス患者 ■ Vogt-小柳 原田病患者  
 健常者、ベーチェット病患者、サルコイドーシス患者、Vogt-小柳-原田病患者のデータを統合し、多様性解析を行った。PERMANOVA 検定をすべてのグループにおいて行ったが、有意差はえられなかった。よって、日本人においてこれらの疾患を有する患者および健常者の間では、唾液中心口腔細菌叢には大きな差がないと考えられる。

## (3) Taxonomic summary

現在までに口腔潰瘍を有するベーチェット病患者には健常者の唾液細菌叢と比較して *Bifidobacterium concisus*, *Prevotella histicola*が多く検出され、*Campylobacter concisus*, *Clostridiales* 菌種, *Fusobacterium periodonticum*, *Gemella sanguinis*, *Neisseria*菌種, *Oribacterium sinus*の検出率が低いという傾向が報告されているが (Seoudi N et al., 2015)、本研究においては *Veillonella*, *Streptococcus*, *Prevotella*が多く検出される傾向が認められた。しかしながら、属レベルでの大きな差は認められなかった。また、サルコイドーシス患者、Vogt-小柳-原田病患者の唾液サンプルの細菌についても同様に検討を行ったが、属レベルでの細菌種構成は、ベーチェット病と同様に *Veillonella*, *Streptococcus*, *Prevotella*が多く検出されたが、属レベルでの大きな差は認められなかった。



#### 引用文献

Noha Seoudi, Lesley A. Bergmeier, Francis Drobniowski, Bruce Paster, and Farida Fortunel, The oral mucosal and salivary microbial community of Behçet's syndrome and recurrent aphthous stomatitis, *J Oral Microbiol.* 7, 2015, 27150.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	植原 治  (UEHARA Osamu)  (00709248)	北海道医療大学・歯学部・助教   (30110)	
研究分担者	北市 伸義  (KITAICHI Nobuyoshi)  (40431366)	北海道医療大学・予防医療科学センター・教授   (30110)	
研究分担者	高井 理衣  (TAKAI Rie)  (50781085)	北海道医療大学・健康科学研究所・助教   (30110)	
研究分担者	安彦 善裕  (ABIKO Yoshihiro)  (90260819)	北海道医療大学・歯学部・教授   (30110)	
研究分担者	千葉 逸朗  (CHIBA Itsuo)  (50250460)	北海道医療大学・歯学部・教授   (30110)	