

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2023

課題番号：17K17381

研究課題名（和文）メタゲノム解析を用いた口腔細菌における内頸動脈狭窄症に対する病原性の追求

研究課題名（英文）Metagenomic Analysis of Bacterial Microflora in Dental and Atherosclerotic Plaques of Patients With Internal Carotid Artery Stenosis

研究代表者

宮久保 あや子 (Miyakubo, Ayako)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：50643706

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）：内頸動脈狭窄症はアテローム性動脈硬化症が原因で生じる疾患である。過去の研究でアテローム病変部位から口腔細菌の検出を認め、口腔細菌とアテローム性動脈硬化症との関連が示唆されてきたが、特定の細菌に着目された研究が多かった。本研究では、内頸動脈狭窄症患者の頸動脈と口腔内プラークの細菌叢を16S rRNAメタゲノムシーケンスで網羅的に解析し、細菌叢の比較検討を行った。その結果、頸動脈プラークから口腔常在菌を含んだ多くの種類の細菌を多数認めた。口腔内だけでなくアテローム病変で認める細菌もまた複雑な微生物叢からなる多菌感染症と考え、アテローム形成・促進にどう関与しているか引き続き研究の必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、アテローム病変部から口腔常在菌を含んだ多くの種類の細菌を多数認め、口腔内だけでなくアテローム病変で認める細菌もまた複雑な微生物叢からなる多菌感染症と考えられる。口腔常在菌に関する包括的な研究は、各細菌の特徴および宿主防御システムとの相互関係を理解するために必要であり、アテローム形成・促進の予防につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Internal carotid artery stenosis is a disease caused by atherosclerosis. Previous studies have detected oral bacteria in atherosclerotic lesions, suggesting an association between oral bacteria and atherosclerosis, but most studies focused on specific bacteria. In this study, we comprehensively analyzed the bacterial flora of carotid artery and oral plaque in patients with internal carotid artery stenosis by 16S rRNA metagenomic sequencing and compared the bacterial flora. The results showed that carotid plaques contained many types of bacteria, including many oral commensal bacteria. The bacteria found not only in the oral cavity but also in atheroma lesions are considered to be a polymicrobial infection composed of a complex microflora, and their involvement in atherogenesis and atherogenesis should be further investigated.

研究分野：有病者歯科

キーワード：頸動脈狭窄症 メタゲノム16S rRNA解析 多菌感染症 異所性感染 口腔内細菌

1. 研究開始当初の背景

内頸動脈狭窄症はアテローム性動脈硬化症が原因で生じる疾患である。過去の研究から、アテローム性動脈硬化症病変部位から口腔細菌の検出や歯周病保有者は健常者に対して脳血管疾患発症の相対リスクが1.66倍[Wu T, et al. Arch Intern Med. 2000]、歯周病の重度なグループは急性冠症候群をおこすリスクが2.8倍であった [Jönsson D, et al. J Intern Med. 2020] と様々な報告がされている。これら疫学的・病理学的報告から過去の研究では、歯周病原菌を中心に口腔細菌とアテローム性動脈硬化が何らかの関係があることが示唆されてきた [Ott SJ, et al. Circulation. 2006]。

歯周病やう蝕は特定病原体が存在するのと同時に共同体となる非病原性細菌の存在が欠かせない[Isoshima D, et al. Odontology. 2021]。これらの口腔疾患の誘因は口腔細菌叢の構成異常(dysbiosis)が関係するとされ、細菌と疾患の関係を理解するには細菌叢を包括的に解析する必要があるとされる[Sudhakara P, et al. Dentistry Journal 2018]。アテローム性動脈硬化症もまた、特定の単一の細菌だけが検出されているわけではなく、複数の種が検出されている [Marques da Silva R, et al. J Vasc Surg. 2006] ため、アテローム性動脈硬化症の病態と細菌叢の関係を理解するためには、細菌叢の包括的な解析が必要であると考えられる。

また、従来の培養法では口腔内の嫌気性菌の大部分は培養不可能であり不十分であり、次世代シーケンサーの登場により、メタゲノム的手法によって全体像が把握できるようになった [Armingohar Z, et al. J Oral Microbiol. 2014]。したがって、次世代シーケンサーなどの手法を用いて遺伝情報を網羅的に解析し、特定の細菌だけでなく細菌間の相互作用や微生物叢の構成種を解析する必要があると考える。

2. 研究の目的

本研究では、内頸動脈狭窄症患者のアテローム病変部プラークと口腔内プラークを用いて、それぞれの細菌叢を16S rRNAメタゲノムシーケンスで網羅的に解析し、口腔細菌叢が内頸動脈狭窄症の病態に寄与しているかどうか検討を行った。

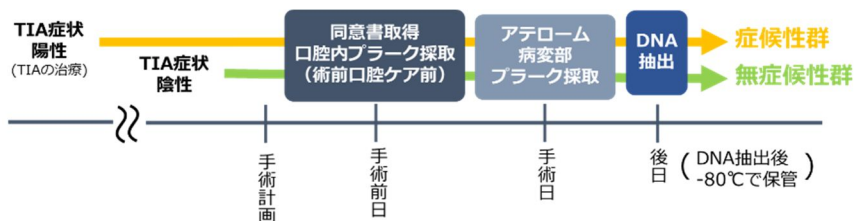
3. 研究の方法

(1) 対象

2016年4月から2018年2月までに昭和大学病院・脳神経外科にて内頸動脈狭窄症のため内頸動脈内膜切除術を行った54例を対象とした。対象患者全員から研究同意と昭和大学臨床試験審査委員会(IRB)の承認のもと実施された。

(2) サンプル採取

上記対象患者より内頸動脈狭窄症の狭窄部位よりアテローム病変部プラークと同一患者の歯頸部から滅菌した探針で口腔プラークの採取を行った。各種サンプルは採取後すぐに-20℃で冷凍後、昭和大学歯学部・口腔微生物講座にて保管した。また、一過性脳虚血発作(TIA)の症状の有無に基づいて、TIA発症の既往がある検体を症候性とそれ以外を無症候群に分け細菌叢を検討した。



(3) メタゲノム解析を用いて細菌叢の解析

アテローム病変部プラークと口腔内プラークからDNAを抽出し、原核生物に特異的な16S rRNAを基にしたUniversal Primerを用いて、16SリボソームRNA(rRNA)遺伝子(V3-4領域)を標的としPCR法を行ったところ、5例のアテローム病変部プラークから細菌の存在が検出された。細菌が検出された患者のアテローム病変部プラークと口腔内プラークに対して16SrRNAを標的としたメタゲノムシーケンス(Illumina Miseq, 300bpペアエンドシーケンス)により解析を行った。得られた塩基配列は、16S rRNAデータベースとの相同性検索し微生物群集解析を行った。

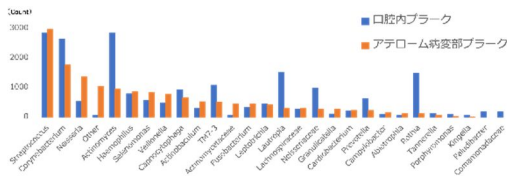
4. 研究成果

頸動脈プラーク(5例)から55科78属(平均値48.0、標準偏差±10.5)の多様な細菌種を認められた。頸動脈プラークから検出された菌の86.5%(Streptococcus属、Actinomyces属、Corynebacterium属が優勢)が口腔内プラークからも同様に検出された。また、頸動脈プラーク

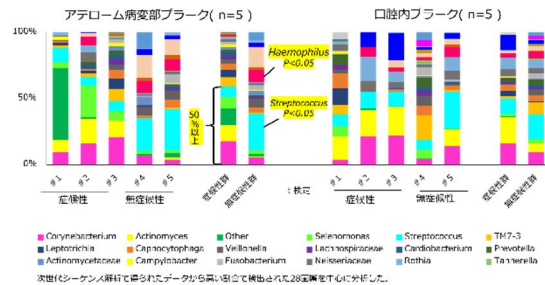
中の細菌はう蝕原因菌が 27.7%、歯周病関連菌が 4.7%であった。症候性群では 90 属 (Shannon Index 平均値 : 13.05) 無症候群では 54 属 (Shannon Index 平均値 : 12.06) の細菌を認め、症候性群の方が Shannon Index の細菌の多様性値が高かった。

結果：口腔内・アテローム病変部ブラークの細菌叢組成 (属レベル)

口腔内ブラーク : 39科57属、アテローム病変部ブラーク : 55科78属
 グラフは、各5名から得られた細菌数の平均値を示し、高率に検出された28の細菌群を中心に分析。
 ◆アテローム病変部ブラークの平均86.5%(最小値 : 63.3 - 最大値 : 91.5%)の細菌が、口腔内ブラークからも検出された。



結果：症候性群と無症候性群における細菌叢組成 (属レベル)



本研究のように口腔常在菌をアテローム病変部位から半数以上認めた研究報告は少ない。また、歯周病原細菌の特性からアテローム病変から特定の歯周病原菌の検出を試みている研究が多いが、う蝕原性菌が歯周病原菌より多く検出された検出報告は、過去の研究報告と比べると珍しい結果となった。血栓形成と微生物叢による "多細菌感染" の関係については、まだ完全には解明されていないが、我々の研究では、症候性血栓と無症候性血栓の両方から複数の細菌が検出され、血栓形成と複数の細菌の存在との関連が示唆された。このことは、血栓形成と複数の細菌の存在との関連を示唆している。

また、われわれの研究結果は検体数が少なく、決定的な統計的な結果を得ることはできなかった。しかし、同一の患者の口腔内とアテローム病変部のサンプルから同一の口腔細菌が多く検出されたことは直接的あるいは間接的に何らかの関係性があることを否定はできない。我々は、内頸動脈狭窄症患者における各細菌の特徴およびそれらの相互関係を理解するためには、う蝕原因菌や歯周病原菌を含む常在細菌に関する包括的な研究が必要であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kyoko Shirakura, Akemi Utsumi, Norimichi Hattori, Tsuyoshi Nakamaki, Ayako Sato, Asako Yamaguchi, Yumi Shibata, Kaori Ono, Luna Osakabe, Mie Myers, Shouji Hironaka, Yasubumi Maruoka	4. 巻 34(2)
2. 論文標題 Predicting the course of hematopoietic neoplasm through oral bacterial examination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Showa University Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 54-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15369/sujms.34.54	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三宅 理子, 佐藤 あや子, 清水 茉莉奈, 松井 庄平, 深町 はるか, 有本 隆文, 桑田 啓貴, 武藤 光範, 木庭 新治, 丸岡 靖史	4. 巻 70
2. 論文標題 アテローム性動脈硬化病変部の細菌叢と口腔細菌叢のメタゲノム解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本口腔科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 254-261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11277/stomatology.70.254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Ayako, Arai Shintaro, Sumi Kenji, Fukamachi Haruka, Miyake Satoko, Ozawa Manami, Myers Mie, Maruoka Yasubumi, Shimizu Katsuyoshi, Mizutani Tooru, Kuwata Hirota	4. 巻 18
2. 論文標題 Metagenomic Analysis of Bacterial Microflora in Dental and Atherosclerotic Plaques of Patients With Internal Carotid Artery Stenosis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Clinical Medicine Insights: Cardiology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/11795468231225852	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤あや子
2. 発表標題 内頸動脈狭窄症における細菌叢と口腔細菌叢のメタゲノム解析
3. 学会等名 日本有病者歯科医療学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮久保 あや子
2. 発表標題 16SrRNAを指標としたPCR法による冠動脈病変部検体からの口腔細菌検出例の報告
3. 学会等名 第72回 日本口腔科学会
4. 発表年 2017年

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関