

令和 5 年 4 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09558

研究課題名(和文)炎症性腸疾患により引き起こされる口腔ディスバイオーシス誘導機構の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of oral dysbiosis associated with inflammatory bowel disease

研究代表者

桑田 啓貴 (KUWATA, HIROTAKA)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：60380523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：食物アレルギーは生命を脅かす疾患である。腸内で細菌叢ディスバイオーシスが起こると、アレルギー症状が悪化する。この仕組みを検証するため、アレルギーモデルマウスを作製し、口腔と腸管で細菌叢が変化させ、免疫系の変化を検証した。OVAアレルギーモデルでは、糞の生菌をMALDI-TOF MSで同定したところ、Citrobacter sp.が増加し、in-vitroでもCitrobacterがil-33を誘導した。in-vivo実験でCitrobacter koseri経口投与がアレルギー症状を悪化させ、Th17細胞が減少した。アレルギーマウスでは唾液sIgAとIgA結合の口腔細菌が増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌の口腔粘膜への影響を確認するため、GFマウスの粘膜免疫系細胞の変化をコンベンショナルマウスと比較、検討している。現在、好中球のみ、表現型の変化が認められた。今後、口腔における好中球の分化誘導の仕組みを解明することで、口腔領域の免疫系の全身との関係性がより明確にすることで、将来的には、全身性疾患の新規治療法の開発が進み、口腔からアプローチすることが可能となるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Food allergy is a life-threatening disease that is exacerbated when dysbiosis of the intestinal microbiota occurs. We created a mouse model of allergic disease and tested for changes in the bacterial flora in the oral and intestinal tracts, as well as in the immune system. We constructed an OVA allergy model in mice and identified some bacteria in feces by MALDI-TOF MS. Citrobacter sp. increased in the feces of allergic mice and induced il33 expression in vitro. In vivo experiments, oral administration of Citrobacter koseri aggravated allergic symptoms and decreased Th17 cells. Salivary IgA and IgA-binding oral bacteria were increased in allergic mice.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌叢 粘膜免疫

### 1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーは、特定の食物に対して生命を脅かすような反応を示す疾患で、特に、腸内細菌叢のアンバランス(ディスバイオーシス)が起きている状態は、症状が悪化すると考えられる。加えて、アレルギー疾患では、宿主免疫応答も特に重要な役割を担っている。

### 2. 研究の目的

口腔由来細菌が腸管などの口腔以外に到達し、ディスバイオーシスを誘導することは、口腔関連の研究領域においても、近年、研究課題として確立されつつある。今回の課題では、アレルギー疾患モデルマウスを作製し、口腔および腸管における細菌叢が変化するか、また、免疫系における変化についても検証し、さらにその変化がどのようなメカニズムによって引き起こされるのかについて調べた。

### 3. 研究の方法

方法としては、BALB/c マウスにオバルブミン(OVA)を注射し、食物アレルギーモデルを構築した後、マウス糞便中の生菌をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)で同定し、分離した糞便中の菌で刺激したマウスの結腸細胞における il33 の遺伝子発現をリアルタイムPCR で定量化した。他に、マウスの腸管 T 細胞についても、フローサイトメトリーで解析した。また、唾液中 IgA 濃度は ELISA により定量化し、IgA 結合口腔内細菌はフローサイトメトリーにより検出した。結果としては、糞便中の細菌では、Citrobacter sp. がアレルギーマウスの糞便中で増加し、この細菌は、colon-26 細胞を用いた *in vitro* の実験系では il33 発現を誘導することも確認された。*in vivo* 実験として

は、*Citrobacter koseri* (JCM1658 株)の経口投与は、全身のアレルギー症状をさらに悪化させ、腸内における Th17 細胞を減少させた。同時にアレルギーマウスでは唾液中の IgA および IgA 結合型口腔内細菌が増加した。以上の結果から、食物アレルギーは腸内細菌と口腔内細菌の両方を誘導することがわかった。

#### 4. 研究成果

*Citrobacter* sp.は腸管上皮細胞からの IL-33 放出を誘導することにより、アレルギー症状を悪化させたことが明らかとなった。続いて、口腔細菌の口腔粘膜に対する影響を調べる目的で、無菌(GF)マウスの口腔粘膜における免疫系細胞の変化をコンベンショナルマウスの口腔と比較することで、検討している。その結果、マクロファージやリンパ球などでは、特に変化は見られなかったが、好中球のみ、表現型の変化が認められた。具体的には、GF マウスの口腔粘膜から採取した好中球は、コンベンショナルマウスの口腔好中球と比較して、形態的に未分化な特徴を示した。さらに、機能的な変化を調べたところ、GF マウスの口腔好中球は、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)産生能の低下が確認された。GF マウスの口腔において口腔常在菌は好中球の未梢分化を起すことが示唆された。今後、口腔における好中球の分化誘導の仕組みを解明することで、口腔領域の免疫系の全身との関係性がより明確にすることで、将来的には、全身性疾患の新規治療法の開発が進み、口腔からアプローチすることが可能となるかもしれない。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Matsui Shohei, Kataoka Hideo, Tanaka Jun-Ichi, Kikuchi Mariko, Fukamachi Haruka, Morisaki Hirobumi, Matsushima Hitomi, Mishima Kenji, Hironaka Shoji, Takaki Takashi, Okahashi Nobuo, Maruoka Yasubumi, Kuwata Hirotaka	4. 巻 88
2. 論文標題 Dysregulation of Intestinal Microbiota Elicited by Food Allergy Induces IgA-Mediated Oral Dysbiosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e0231101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/IAI.00741-19	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 -

1. 著者名 Ota Chiaki, Morisaki Hirobumi, Nakata Masanobu, Arimoto Takafumi, Fukamachi Haruka, Kataoka Hideo, Masuda Yoshiko, Suzuki Noriyuki, Miyazaki Takashi, Okahashi Nobuo, Kuwata Hirotaka	4. 巻 86
2. 論文標題 Streptococcus sanguinis Noncoding cia -Dependent Small RNAs Negatively Regulate Expression of Type IV Pilus Retraction ATPase PilT and Biofilm Formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/IAI.00894-17	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 -

1. 著者名 Arimoto Takafumi, Yambe Rei, Morisaki Hirobumi, Umezawa Haruka, Kataoka Hideo, Matsui Shohei, Kuwata Hirotaka	4. 巻 365
2. 論文標題 Influence of excess branched-chain amino acid uptake by Streptococcus mutans in human host cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsle/fnx273	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 -

1. 著者名 Hiromura Munenori, Nohtomi Kyoko, Mori Yusaku, Kataoka Hideo, Sugano Marika, Ohnuma Kei, Kuwata Hirotaka, Hirano Tsutomu	4. 巻 495
2. 論文標題 Caveolin-1, a binding protein of CD26, is essential for the anti-inflammatory effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on human and mouse macrophages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 223 ~ 229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.11.016	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 -

1. 著者名 KOBAYASHI Mikihiro, INAGAKI Rina, ICHIKAWA Kotona, NIIZUMA Yuiko, MORISAKI Hirobumi, KUWATA Hirotaka, MANABE Atsufumi, MIYAZAKI Takashi	4. 巻 38
2. 論文標題 Effect of kinematic viscosity on the staining performance of caries detector dyes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 120 ~ 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2017-083	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 -

1. 著者名 Hoashi-Takiguchi Sumire, Morisaki Hirobumi, Itsumi Momoe, Kikuchi Mariko, Fukamachi Haruka, Kurosawa Mie, Yamada Michi, Suzuki Noriyuki, Kuwata Hirotaka	4. 巻 30
2. 論文標題 Novel antibody assessment method for microbial compositional alteration in the oral cavity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101269 ~ 101269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101269	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8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Manami Hayashi, Momoe Itsumi, Mina Mori, Haruka Fukamachi, Hirotaka Kuwata
2. 発表標題 Mechanism of exacerbation of pneumonia by oral commensals in HOMA mouse model
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会 (国際学会)
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 森 美菜, Natasa Trtic, 逸見 百江, 中村 夏野, 林 真奈美, 深町 はるか, 桑田 啓貴
2. 発表標題 常在細菌は口腔内の免疫細胞の分化に重要な役割を果たしている
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会 (国際学会)
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 Hirotaka Kuwata, Mariko Kikuchi, Miki Kadena
2. 発表標題 The modulatory function of pineal gland hormone melatonin in encephalomyocarditis virus infection.
3. 学会等名 2019 IADR/AADR/CADR general session (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井庄平、片岡嗣雄、丸岡靖史、桑田啓貴
2. 発表標題 食物アレルギーマウスにおける腸内細菌叢のディスバイオーシスの解析
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mariko Kikuchi, Miki Kadena, Hirotaka Kuwata
2. 発表標題 The modulatory function of pineal gland hormone melatonin in encephalomyelitis virus infection. Mariko Kikuchi <sup>1</sup> , Miki Kadena <sup>2</sup> , Hirotaka Kuwata <sup>3</sup>
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideki Matsui, Hideo Kataoka, Hirotaka Kuwata
2. 発表標題 Analysis of intestinal dysbiosis in murine model of food allergy.
3. 学会等名 International conference of oral microbiology and immunology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroataka Kuwata
2. 発表標題 The Oral Microbiome and Systemic Diseases Connection.
3. 学会等名 International Scientific Forum XII-2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 非結核性抗酸菌・臨床分離株で産生される新規糖ペプチド脂質抗原の生合成遺伝子群解析
2. 発表標題 藤原永年、綾田稔、中崇、桑田啓貴、前田伸司
3. 学会等名 91回日本細菌学会総会 (国際学会)
4. 発表年 2018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