

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10068

研究課題名(和文) IgA抗体による口腔内細菌叢の制御

研究課題名(英文) The regulation of oral microbiota by IgA

研究代表者

孫 安生 (Son, Aoi)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：30447924

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)：当初の研究計画では、マウス腸管由来モノクローナルIgA抗体が結合する口腔内細菌についてスクリーニングする予定であったが、申請者の所属研究機関が初年度途中で変更となり、IgAライブラリーを使用できなくなったため、研究計画に修正を加えた。炎症性腸疾患患者の便サンプルから口腔内細菌が確認されたという報告から口腔内細菌と炎症性腸疾患発症との関連性について研究を行った。次世代シーケンサー解析により腸管に存在する口腔内細菌の探索を行った結果、Fusobacterium属などの口腔内細菌の存在が確認された。これらの菌を分離しマウスに経口投与したところ腸管粘膜固有層でのCD11b陽性細胞の増加が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、炎症性腸疾患は生産年齢層を中心に患者数が増加しており、社会的問題となっている。その発症には腸内細菌の乱れ(dysbiosis)が原因の一つであると言われているが、宿主側の恒常性維持力や免疫応答バランスも関与していると考えられ、その因果関係を明らかにすることは容易ではない。炎症性腸疾患患者の便サンプルから口腔内細菌が確認されたことから、口腔内細菌叢と腸内細菌叢の関連性について注目が高まっている。潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患は、根本的な治療法や病因が確立されておらず口腔内細菌叢と関連からアプローチする。

研究成果の概要(英文)：The original research plan was to screen for oral bacteria to which mouse intestine-derived monoclonal IgA antibodies bind, but the applicant's research institution changed during the first year and the mouse intestine-derived monoclonal IgA library could no longer be used, so the research plan was revised. Based on a report that oral bacteria were identified in stool samples from patients with inflammatory bowel disease, we conducted research on the relationship between oral bacteria and the development of inflammatory bowel disease. First, we searched for oral bacteria in the intestinal tract by next-generation sequencing analysis. As a result, the presence of oral bacteria such as Fusobacterium and Bifidobacterium was confirmed. Furthermore, when these bacteria were isolated and orally administered to antibiotic-treated mice, an increase in CD11b-positive cells in the colocal was observed in mice treated with Fusobacterium.

研究分野：細菌叢解析 免疫学

キーワード：口腔内細菌叢 腸内細菌叢 免疫細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、歯周病菌は動脈硬化、肝硬変、癌、早産などの様々な全身疾患との関わりが次々と報告されており、口腔内環境を良好な状態に維持することが健康維持に重要であると考えられるようになった。口腔内細菌への注目はますます高まっているが、口腔内細菌叢の制御がどのように行われているかは詳細な研究がなされておらず、不明な点が多い。口腔内では多量の唾液が分泌されることや、硬組織と軟組織が混在する複雑な器官であることなどから、口腔内の免疫環境や細菌叢を解析することは困難であった。16S rRNA 解析などの発展に伴い、口腔内細菌叢の解析は飛躍的に進んだが、その細菌叢制御に関する報告は少ない。現在臨床で行われている歯周病治療は、ブラッシングやスケーリング・ルートプレーニングなどの機械的なプラークコントロールと抗菌薬の併用である。機械的なプラークコントロールは患者のみでは限界があり(特に高齢者や有病者) 通院による PMTC (Professional Mechanical Tooth cleaning) が必要であったり、また抗菌薬の使用は、耐性菌の出現やアレルギー・副作用などの問題があったりする。そこで申請者らは、新規口腔内細菌叢制御薬のシーズとして、IgA 抗体を利用できないかと考えた。しかし、IgA 抗体を医薬品として応用するためには、分子レベルでの具体的な作用機序を明らかにする必要がある。

当初の研究計画では、マウス腸管由来モノクローナル IgA 抗体が結合する口腔内細菌についてスクリーニングにより分類する予定であったが、申請者の所属研究機関が初年度途中で変更となりマウス腸管由来モノクローナル IgA 抗体ライブラリーを使用できなくなったため、研究計画に修正を加えた。炎症性腸疾患患者の便サンプルから口腔内細菌が確認されたという報告もあり、潰瘍性大腸炎(UC)術後回腸囊炎患者便サンプルについて腸内細菌叢解析を行い口腔内細菌叢との関連性について研究を行った。潰瘍性大腸炎(UC)術後回腸囊炎患者便サンプルについて解析を行った。UC 術後回腸囊炎は UC の病態を反映しているという点と経時的なサンプリングが可能であるという点から、細菌叢の変化を調べるには適している。

2. 研究の目的

UC による回腸囊造設後の回腸囊炎発症率と、家族性ポリポージスによる回腸囊造設後の回腸囊炎発症率を検討し、UC による回腸囊造設後において顕著に回腸囊炎が起こることが報告された。このことから、UC による回腸囊造設後の回腸囊炎は UC の病態を反映しており、その解析は UC 発症の原因解明に繋がるものと考えられる。炎症性腸疾患患者の便サンプルから口腔内細菌が確認されたという報告から、口腔内細菌と腸内細菌の共通する菌を分離し、その機能を評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーによる細菌叢解析と菌の同定

UC 術後回腸囊炎患者の糞便サンプルより口腔内細菌叢と腸内細菌叢に共通する菌を単離し、nanopore MinION 次世代シーケンサーおよびダイレクトシーケンス法により種を同定した。また、同定された菌を分離培養した。

(2) 口腔内 腸管内共通細菌の機能評価

UC 術後回腸囊炎患者便サンプルから分離された菌について、腸炎にはどのように関与しているのかをマウス実験で検討した。抗生剤投与により無菌化した野生型マウスに分離菌を経口移植して病態および腸管免疫細胞の解析を行った。マウス腸炎のモニタリングとしては、糞便中

の炎症マーカーであるリポカリン2をELISA法にて測定し、腸炎の程度を大腸粘膜固有層の炎症性細胞の割合で評価した。

4. 研究成果

まず次世代シーケンサー解析により腸管に存在する口腔内細菌の探索を行った。その結果、*Fusobacterium* 属や *Bifidobacterium* 属などの口腔内細菌の存在が確認された。さらに嫌気培養による患者便サンプルからの菌の分離にも成功した。これらの菌が腸管でどのような免疫応答を引き起こしているのかを調べるため、抗生剤処理したマウスに分離菌を経口投与し、腸管免疫細胞の解析を行った。その結果、*Fusobacterium* 属の分離菌をマウスに投与することにより、マウス糞便中のリポカリン2 (Lcn2) は上昇し (図1)、腸管粘膜固有層でのCD11b陽

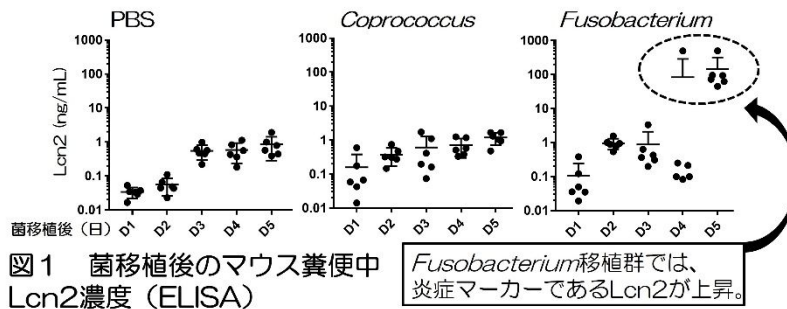


図1 菌移植後のマウス糞便中Lcn2濃度 (ELISA)

性細胞の増加が認められた。これらのことから、*Fusobacterium* 属は腸内で炎症を惹起していることが示唆された。また、*Fusobacterium* 属は口腔癌や大腸癌との関連性が報告されており、その病

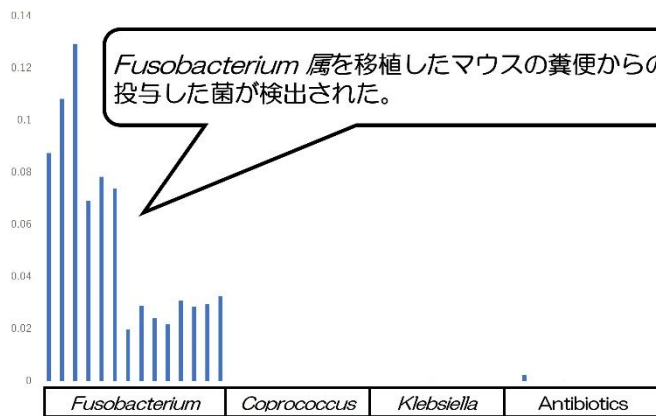


図2 マウスに移植した菌と便中から検出された *Fusobacterium* 属の存在比

因の1つとしては病変組織への浸潤が考えられている。*Fusobacterium* 属の腸管組織への定着を調べたところ、*Fusobacterium* 属を移植したマウスの糞便からのみ、投与した菌が検出された (図2)。この時、定着率と比例してCD11b陽性細胞の割合が高くなることが分かった (図3)。

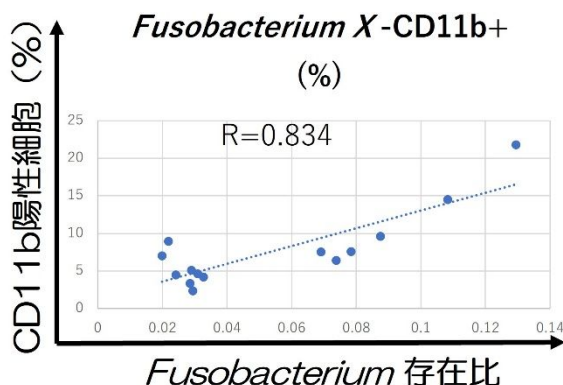


図3 マウス糞便中 *Fusobacterium X* の存在比とマウス腸管CD11b陽性細胞 (%) の相関

糞便中の *Fusobacterium X* の存在比が大きいと腸管CD11b陽性細胞の割合が増える。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 孫 安生、新藏 礼子	4. 巻 72
2. 論文標題 腸管IgAと消化管細菌叢の相互作用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 174 - 179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 HANAWA Soutaro, NOGUCHI Kazuma, SON Aoi, OHMAE Takayuki, OMORI Yuji, KAWABE Mutsuki, YOSHIKAWA Kyohei, YAMANEGI Koji, TAKAOKA Kazuki, KISHIMOTO Hiromitsu
2. 発表標題 Metagenomic analysis on oral microbiome associated with clinico-pathological features in the oral cancer patients
3. 学会等名 9th World Congress of the International Academy of Oral Oncology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 HANAWA Soutaro, NOGUCHI Kazuma, SON Aoi, OHMAE Takayuki, OMORI Yuji, KAWABE Mutsuki, YOSHIKAWA Kyohei, YAMANEGI Koji, TAKAOKA Kazuki, KISHIMOTO Hiromitsu
2. 発表標題 Relationship between metagenomic analysis of oral microbiome and clinico-pathological features in the oral cancer patients
3. 学会等名 第68回日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 孫 安生
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎術後回腸囊炎発症における腸内細菌叢解析
3. 学会等名 医学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2023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
研究 分 担 者	新藏 礼子 (Shinkura Reiko) (50362471)	東京大学・定量生命科学研究所・教授 (12601)	削除

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
---------	---------