

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10087

研究課題名(和文) 口腔細菌による発がんリスク要因の探索とその対策について

研究課題名(英文) Survey on carcinogenic risks by oral bacteria and their measures

研究代表者

苔口 進 (Kokeguchi, Susumu)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：10144776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌は胃癌においてまた腸内細菌叢と大腸癌との関連も研究されている。Fusobacterium nucleatum(FN)等の口腔内細菌は様々な癌病巣から分離されるが、癌発症との関係は不明である。本研究では直接的、間接的な発癌性の可能性を検討した。FNの抽出物はAmes testでは変異原性を示さなかった。胃前癌状態の胃内視鏡試料から発癌性N-ニトロソ化合物を産生する ActinomycesやStreptococcus 等の硝酸塩還元性口腔細菌が分離され、THP細胞からIL-8やTNF- α 等の炎症性サイトカインを産生した。現在、口腔内細菌ゲノム解析で癌蛋白質 CagAの探索を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、超高齢化社会へ進む我が国の死亡原因の第1位である癌への対策が急務である。胃癌はピロリ菌の持続感染がその発生リスク要因であり、大腸癌は腸内細菌叢が関わる事が明らかとなった。各種の癌病巣から Fusobacterium nucleatumをはじめ様々な口腔細菌種が分離されているが、発癌との関わりは今だ不明である。本研究は近年増加している食道や咽頭また消化器系の癌発生における口腔細菌の直接的あるいは間接的な関わり、さらには発生メカニズムの解明を目指した。また最新の細菌ゲノム解析を用いてピロリ菌の発癌蛋白CagA類似遺伝子を口腔細菌種で探索した。ピロリ菌発見以来その学術的、社会的な意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori is a well-known bacterial carcinogen in gastric cancer. The possible association between intestinal bacterial flora and colorectal cancer has been also most studied. The several oral bacteria species such as Fusobacterium nucleatum etc. have been frequently isolated from various cancer regions. However, the relationship between oral bacteria and cancer development remains inadequate. The aim of this study is to reveal direct or indirect carcinogenic potential in oral bacteria. The extracts of F. nucleatum was not mutagenic in the Ames test. Several Nitrate-reducing oral bacteria, including Actinomyces and Streptococcus were isolated from the Gastroscopy samples in the gastric precancerous state, which produce the main carcinogenic N-nitroso compounds. These bacteria showed the potential production of inflammatory mediators such as IL-8 and TNF- α with THP cells in the relation to mutagenesis. The genome analyses of oral bacteria to find oncoprotein CagA are ongoing.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：口腔細菌 変異原性

1. 研究開始当初の背景

がんは様々な要因によって細胞の複数の遺伝子の変異が集積することで、細胞増殖異常が引き起こされる疾患であるが、なかでもピロリ菌による胃がんやチフス菌による肝臓がんさらには腸内細菌叢の変化による大腸がんなどに代表されるように、慢性細菌感染症ががん発症リスクに関与することが明らかにされている。口腔領域には数百種類以上の口腔細菌が常在しており、その細菌叢の変化によって口腔慢性細菌感染症(う蝕や歯周病)が発症するが、口腔細菌は口腔領域だけでなく様々な全身健康や心臓疾患、肺炎、糖尿病などの重篤な疾患にも深く関係していることが明らかになってきている。しかしながら、口腔細菌の発がんへの関連はいまだ不明のままである。

一方、様々ながん病巣からの口腔細菌分離や腸内細菌叢の網羅的解析研究の結果、口腔がん、食道がんさらには大腸がんの病巣において口腔細菌種 *Streptococcus anginosus* や *Fusobacterium nucleatum* などの存在や細菌叢の変化が報告され、ある特定の口腔細菌種が口腔がんさらには口腔から繋がる食道から大腸への消化器系のがんの発生にも関わるとの着想を得て本研究を開始した。

2. 研究の目的

日本人のがんの中で多い胃がんはピロリ菌の持続感染がその発生リスク要因のひとつとして明らかになり、現在、ピロリ菌検査が普及し、ピロリ菌保菌者に対しては抗菌薬による除菌療法が進められ、胃がん発生リスクの軽減が研究成果として集積されつつある。一方、食生活や生活習慣の欧米化で大腸がんの増加が懸念されている。

現在、複雑な腸内細菌叢について次世代シーケンサーを用いてそのマイクロバイオーム解析が進められており、大腸がんの患者の腸内細菌叢では *Clostridium* 属細菌種や口腔内にも生息する *Fusobacterium* 属細菌種が増加しており、口腔細菌種の消化器系の発がんへの関与の可能性が指摘され、注目されている。

さらには、口腔がんや食道がんの病変からは *S. anginosus* をはじめとする口腔レンサ球菌やその他の口腔細菌種も分離されているが、それら口腔細菌種の発がんへの関与はいまだ不明のままである。ピロリ菌では CagA (Cytotoxin-associated gene A antigen) が胃上皮細胞を障害し、さらに異常な細胞増殖シグナル反応が起こし、がん化のプロセスが進むという発がん機序が明らかにされている。

細菌慢性感染が発がんリスク要因のひとつと考えられているが、口腔細菌種による発がん機序については1)ニトロソ化合物、アセトアルデヒドや過酸化水素や硫化物などの代謝産物による直接的、あるいは2)サイトカイン産生など免疫系を介して慢性炎症からの間接的な細胞障害などが挙げられてはいるものの、未だ推測の域を出ていない。

そこで本研究の目的を、

1)ピロリ菌では変異原活性が認められるが、大腸菌では認められないという有元らによって最近開発された新しい高感度変異原活性試験を口腔細菌種に適用して調べる。

2)慢性胃炎など前がん状態が疑われ、ピロリ菌検査のため実施した胃内視鏡試料から、ピロリ菌と併せて、発がん性N-ニトロソ化合物を産生する硝酸塩還元性口腔細菌も分離する。分離した細菌種を特定し、それらのTHP細胞からTNF- α やIL-8等の炎症性サイトカインの産生について調べる。

3)口腔細菌種について細菌ゲノム解析を行い、ピロリ菌の発がん蛋白CagA類似遺伝子をバイオフィロムにて探索する。

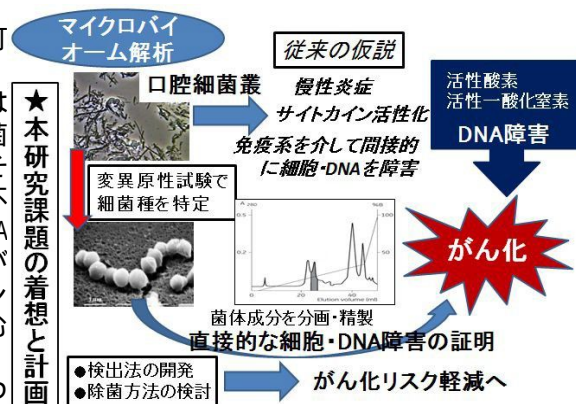
4)口腔内バイオフィロム(口腔内プラーク)を分解する酵素類を探索することで、口腔細菌数を減少させ、口腔疾患ひいては発がんリスク軽減する。

という大きな4項目に設定した。

3. 研究の方法

1)口腔細菌 *Fusobacterium nucleatum* の変異原活性測定

嫌気培養した *F. nucleatum* (ATCC25586) 菌体から sonic extract (蛋白含量 40 mg/mL) および distilled water extract (蛋白含量 8 mg/mL) を得て、これを試験サンプル (SK-1 および SK-2) とした。変異原性評価は高感度な変異原性が検出できるエイムス試験 (Arimoto-Kobayashi S, Ohta K, Yuhara Y, Ayabe Y, et al. Mutagenicity and clastogenicity of extracts of *Helicobacter pylori* detected by the Ames test and in the micronucleus test using human lymphoblastoid cells. *Mutagenesis*. 2015;30(4):537-44.) によって、国際ガイドラインに基

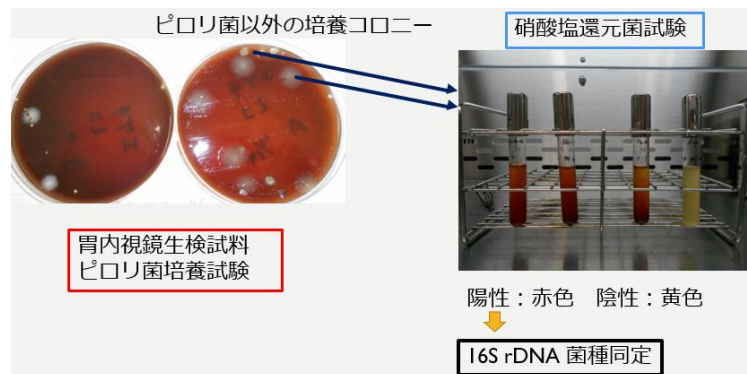


づいて行った。試験菌株はネズミチフス菌 (*Salmonella enterica* subspecies I, serovar *Typhimurium* (*Salmonella typhimurium*)) TA97, TA98, TA100, TA102 および YG7108 株を用い、代謝的活性化がある場合とない場合の両条件 (それぞれ+S9 または-S9 と表記) で、5段階各 10 倍希釈の濃度範囲で試験を行った。陽性・陰性の判定は、エイムスらの基準に従い、溶媒コントロールの 2 倍以上の値が出た場合を陽性とした。

2) 胃内視鏡試料からの口腔細菌の分離およびサイトカイン産生能について

ピロリ菌感染胃炎が示唆された患者について上部消化管内視鏡時にピロリ菌の培養目的で採取した胃粘膜生検試料からピロリ菌以外の菌を分離した。試料は 7% 馬血清添加 BHI 培地に塗抹し、1 週間培養を行った。

得られた菌について 16S rDNA 塩基配列に基づいて菌種の同定を行い、硝酸塩還元試験で硝酸塩還元能を評価した。硝酸塩還元試験は菌を硝酸カリウム添加ブイオンに植え継ぎ、培養後、 α -ナフチルアミン酢酸液を 50 μ L、スルファニル酸液を 50 μ L ずつ添加した。ブイオンが黄色から赤色に変化したものを硝酸塩還元陽性菌とした。



分離した硝酸塩還元陽性菌 (*Actinomyces oris*, *Actinomyces odontolyticus*, *Streptococcus salivarius*) について、サイトカイン誘導は THP 細胞と単独菌あるいはピロリ菌と共培養して THP 細胞からの TNF- α と IL-8 産生を調べた。

3) 口腔細菌種の細菌ゲノム解析

代表的な口腔細菌種を培養し、ゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA は KAPA HyperPlus Library kit で処理した後に次世代シーケンサー Illumina MiSeq を使用して、ゲノムシーケンス解析を行った。

実施にあたっては、岡山大学病院バイオバンクと Cugini 博士 (Rutgers School of Dental Medicine) の協力を得た。

4) 口腔バイオフィルムを分解する酵素類の探索

口腔細菌種が生息する口腔バイオフィルムの主な構成成分である α -1,3 グルカン (不溶性グルカン) を分解する酵素を産生する *Flavobacterium* EK-14 菌を得た。EK-14 菌と近縁菌のゲノムデータから不溶性グルカン分解酵素をコードする遺伝子群を探索し、共通する領域から PCR プライマーを設計し、*Flavobacterium* EK-14 菌ゲノム DNA から不溶性グルカン分解酵素遺伝子を PCR 増幅した。さらに、PCR 断片から不溶性グルカン分解酵素遺伝子の全長をクローニングし、酵素活性を有するリコンビナント蛋白の発現を確認した。

実施にあたっては、山形大学工学部 矢野成和博士の協力を得た。

4. 研究成果

1) 口腔細菌 *Fusobacterium nucleatum* の変異原性活性

SK-1 および SK-2 は、フレームシフト変異を検出する TA97 株、TA98 株、塩基対置換型変異を検出する TA100 株とともに、+S9 または-S9 とともに、いずれの濃度でも溶媒コントロールの 2 倍以上の値が出たものはなかった。また、酸化 DNA 損傷による変異検出に用いられる TA102 株、アルキル化 DNA 損傷による突然変異に高感度な YG7108 によっても、ともに変異原性は検出されなかった。従って、*F. nucleatum* 抽出物 SK-1 および SK-2 は今回の試験条件において、エイムステスト陰性と評価された。今後さらに、この測定法を活用して、がん病巣から分離された他の口腔細菌種 *Streptococcus anginosus* 等についても検討したい。

2) 胃内視鏡試料からの硝酸還元細菌およびサイトカイン産生能

ピロリ菌とともに分離された硝酸塩還元陽性菌は、口腔細菌である *Actinomyces*, *Rothia*, 口腔・消化管粘膜の常在菌としての *Streptococcus*, *Gemella* さらに、*Klebsiella*, *Escherichia* の腸内細菌群、皮膚や粘膜の常在菌 *Staphylococcus* であり、その多くが口腔内常在菌であった。胃粘膜の萎縮が進んだ症例からは口腔細菌に加えて腸内細菌も分離された。

A. oris は TNF- α 産生はピロリ菌と同程度であったが、*S. salivarius* と *A. odontolyticus* は、単菌でもピロリ菌より強い細胞傷害性を示すことが分かった。3 菌種をそれぞれピロリ菌と共存させると、*S. salivarius* は菌単独の場合よりもさらに強い TNF- α 産生が認められた。

また、好中球や顆粒球の走化性を誘導やがんの転移を促進する IL-8 はピロリ菌単独刺激で THP 細胞から産生される。*S. salivarius* と *A. odontolyticus* でも、単菌でも THP 細胞から IL-8 産生を認めた。ピロリ菌と共存させると、*S. salivarius* と *A. oris* は単菌の場合より強い IL-8

誘導が認められた。

ピロリ菌と発がん物質であるニトロソ化合物を生じる硝酸還元陽性口腔細菌との相互作用はいまのところ不明である。また調べた硝酸還元陽性口腔細菌種はピロリ菌よりも炎症反応を強く誘導する可能性が示唆され、ピロリ菌との共存では胃炎が激しくなるかもしれない。ピロリ菌とともに感染した硝酸塩還元陽性口腔菌の新しい発がん機序が証明できる可能性がある。

3) 口腔細菌種の細菌ゲノム解析

これまでに *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* と *Porphyromonas gingivalis* についてはゲノム解析が終了した (Draft Genome Sequences of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Strains 310a and 310b. May AC, Ohta H, Maeda H, Koikeguchi S, Cugini C. Genome Announc. 2017 Nov 22;5(47):e01282-17. doi: 10.1128/genomeA.01282-17.; Draft Genome Sequence of *Porphyromonas gingivalis* Strain 381 Okayama (3810KJP) Stock Culture. May AC, Maeda H, Kurihara H, Miyamoto M, Hongyo H, Tanimoto I, Nagai A, Nishimura F, Murayama Y, Kato K, Koikeguchi S, Cugini C. Microbiol Resour Announc. 2019 Feb 28;8(9):e01641-18. doi: 10.1128/MRA.01641-18. eCollection 2019 Feb.)。

臨床分離株 *A. actinomycetemcomitans* にも細胞障害性を示す白血球毒素や cytolethal distending toxin (CDT; 細胞膨化致死因子) 遺伝子は存在したが、発がんとの関連性は不明である。ピロリ菌の発がん蛋白 CagA に高い相同性を示す類似遺伝子はこれまで見つかっていない。引き続き、口腔細菌 *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga* についてもゲノム解析を進めている。

4) 口腔バイオフィルムを分解する酵素類の探索

Flavobacterium EK-14 株の不溶性グルカン分解酵素遺伝子をクローニングし、不溶性グルカン分解酵素活性を示すリコンビナント酵素を得ることができた。口腔バイオフィルムを分解することでそこに生息する口腔細菌量を減少させ、発がんリスク軽減に繋げたい。

口腔細菌が関連する慢性感染症としての口腔疾患 (う蝕や歯周病) は、近年、糖尿病の増悪や心疾患さらには肺炎など全身健康にも影響することが明らかにされているが、口腔がん、食道がんさらには消化器がんへの関連は不明である。現在、マイクロバイオーーム解析によって腸内細菌叢の膨大な解析が進められ、腸内細菌叢の増悪化、特に *Clostridium* 属細菌や *Fusobacterium* 属細菌の増加は大腸がんの発がんリスクを高めるという衝撃的な報告がなされ、口腔細菌叢の関与も疑われ、我が国の死亡原因の第1位であるがんへの対策が急務となっている。

本研究は「口腔細菌が口腔領域のがんや消化器系のがんにも関与するのでは？」という斬新な着想と創造性あふれるアイデアに富んだ先駆け的なものであった。この研究は近年増加している口腔領域近傍の食道や咽頭また消化器系における発がんにおける口腔細菌の関わり、さらには発生メカニズムの解明や検査法や予防法の “break through” に繋がり、胃がんでのピロリ菌発見以来、その社会的意義は極めて大きいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 佐藤 妃映, 横田 憲治, 渡辺 朱理, 荅口 進, 衛藤 友美, 高阪 翔士	4. 巻 48
2. 論文標題 尿沈渣標本中に出現する顆粒状物質と尿路細菌叢との関連について	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本防菌防黴学会誌	6. 最初と最後の頁 623-628
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 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 Watanabe Akari, Watanabe Tokiko, Kokeguchi Sssumu, Yamamoto Yumiko, Mstsushita Osamu, Yokota Kenji	4. 巻 26
2. 論文標題 Environmental survey of Methicillin-Resistant Staphylococci in a Hospital in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biocontrol Science	6. 最初と最後の頁 137 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4265/bio.26.137	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 Ichihara Aina, Ojima Hinako, Gotoh Kazuyoshi, Matsushita Osamu, Take Susumu, Okada Hiroyuki, Watanabe Akari, Yokota Kenji	4. 巻 13
2. 論文標題 Serodiagnosis and Bacterial Genome of Helicobacter pylori Infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 467 ~ 467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins13070467	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 Kobatake Tomomi, Ogino Keiki, Sakae Hiroyuki, Gotoh Kazuyoshi, Watanabe Akari, Matsushita Osamu, Okada Hiroyuki, Yokota Kenji	4. 巻 Volume 14
2. 論文標題 Antibacterial Effects of Disulfiram in Helicobacter pylori	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Infection and Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 1757 ~ 1764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/IDR.S299177	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 Arimoto-Kobayashi Sakae, Hida Ryoko, Fujii Nana, Mochioka Ryosuke	4. 巻 43
2. 論文標題 Antimutagenic, anti-inflammatory, and antioxidative activities of the juice of <i>Vitis ficifolia</i> var. <i>Ganebu</i> , a woody vine in the grape family, known as <i>Ryukyu-ganebu</i> in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes and Environment	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) 10.1186/s41021-021-00225-y	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Akari Watanabe, Kenji Yokota, Naofumi Tamaki and Susumu Kokeguchi
2. 発表標題 Microbial Contamination and Growth in Feeding Cups
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2019, Australia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有元佐賀恵、苔口 進
2. 発表標題 発癌への関与が疑われる口腔常在細菌 <i>Fusobacterium nucleatum</i> (ATCC25586) 抽出物の変異原性評価
3. 学会等名 第27回日本がん予防学会総会 がん予防学術大会2020米子
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺 朱理、栗本 実奈、苔口 進、松山 美和
2. 発表標題 ATP測定法を用いた効果的な口腔清掃方法の検討
3. 学会等名 日本歯科衛生学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Dr. Carla Cugini
<http://sdm.rutgers.edu/research/center/cugini.html>

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	横田 憲治 (Yokota Kenji) (00243460)	岡山大学・保健学域・教授 (15301)	
研究 分担者	村上 純 (Murakami Jun) (40362983)	岡山大学・歯学部・博士研究員 (15301)	
研究 分担者	有元 佐賀恵 (Arimoto Sakae) (90212654)	岡山大学・医歯薬学域・准教授 (15301)	
研究 分担者	渡辺 朱理 (Watanabe Akari) (80585026)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・講師 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	矢野 成和 (Yano Shigekazu)	山形大学・大学院理工学研究科・准教授 (11501)	

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			
米国	Rutgers School of Dental Medicine			