

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19162

研究課題名（和文）メタゲノム・メタ16S解析を用いた口腔癌患者の腸内並びに口腔内細菌叢の多様性解析

研究課題名（英文）Diversity analysis of gut and oral microbiome in oral cancer patients using metagenomic and meta-16S analysis

研究代表者

松井 健作（Matsui, Kensaku）

広島大学・病院（歯）・歯科診療医

研究者番号：60826874

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：健康人と口腔癌患者において、腸内および口腔内細菌叢をT-RFLP法により解析を遂行し、健康人と治療開始前の口腔癌患者間での細菌叢が異なることを明らかにした。また、治療開始後から経時的な検体採取により、長期的な細菌叢の変化を解析した。口腔内細菌叢については、種レベルにおける菌叢構造の差異を見出すため、次世代シーケンサーを用いたメタ16s解析を実施した。その結果、健康人と口腔癌患者では異なる菌種が存在し、菌叢構造も異なることを明らかにした。さらに、患者の末梢血の余剰から免疫関連細胞を測定し、治療開始前と治療開始後の経時的な免疫能の変化や、特定の細菌が免疫能の変化に与える影響を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上述のように腸内細菌叢と免疫療法の治療効果について明らかにすることにより、口腔癌患者の治療期間中の腸内細菌叢および腫瘍部位である口腔細菌叢の状態や変動を明らかにし、これらの細菌叢の癌治療への影響を解明することは、プロバイオティクス/シンバイオティクスを用いた新規口腔癌治療の開発や、免疫力賦活化による治療成績の向上に寄与するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：We used the T-RFLP method to analyze the gut and oral microbiome of healthy subjects and oral cancer patients, and found that the microbiome differed between healthy subjects and oral cancer patients before the start of treatment. We also analyzed the long-term changes in the microbiome by collecting samples over time after the start of treatment. For the oral microbiome, meta-16s analysis using next-generation sequencers was conducted to find differences in the structure of the microbiome at the species level. As a result, we found that there were different species and structures of microbiome in healthy subjects and oral cancer patients. Furthermore, we measured immune-related cells from the surplus of peripheral blood of the patients to examine the changes in immunocompetence over time before and after the start of treatment, and the influence of specific bacteria groups on the changes in immunocompetence.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔内細菌叢 腸内細菌叢 口腔癌

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管内には約 1000 種類、総数 100 兆個に及び腸内細菌が共存しており、腸内細菌叢は実質的な臓器とも呼ばれている。近年、次世代シーケンサーとバイオインフォマティクスの発達により、細菌叢から細菌ゲノムを調製し、16S rRNA 遺伝子だけでなく、ゲノム全体をシーケンスして細菌叢全体の遺伝子組成を解析し、細菌叢全体(マイクロバイーム)を解析できるようになった。これらの細菌の 16S rRNA 解析を用いることにより、腸内細菌の構成が異常になる dysbiosis という状態と多くの疾病との関連が報告され腸内細菌への関心が国内外で高まっている。

腸内細菌叢の状態が、癌患者の臨床病態や癌治療による抗腫瘍効果に影響を与えるメカニズムの 1 つとして、腸内細菌が産生する代謝産物による影響が考えられている。特に、腸内細菌の代謝産物である短鎖脂肪酸は、*Clostridiales* 目などから産生され、短鎖脂肪酸受容体を介したエピゲノム変化によって制御性 T 細胞への分化を誘導することが報告されており、腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸が生体の恒常性の維持や免疫制御に影響することが明らかとなってきている。さらに、免疫応答が重要視されており PD-L1 (programmed cell death-ligand 1)/PD-1(programmed cell death 1) 関与が指摘されている。

以上のことから、ヒトにおいても癌免疫療法の治療効果と腸内細菌叢の状態は密接な関係があることが予測された。さらに、化学療法や放射線療法の治療効果も生体の細胞性免疫を利用して治療効果が発揮されることから、これらの治療効果が生体の腸内細菌叢の状態によって影響を受けている可能性が考えられる。

しかし、現在までに口腔癌治療中の患者の腸内細菌叢ならびに口腔細菌叢について経時的に検討を行った報告はなく、これらの細菌叢の状態が患者の臨床経過や治療効果にどのように影響しているかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌(OSCC)患者の腸内ならびに口腔内細菌叢の状態を治療前、治療後を継続的に解析し、OSCC 患者における特定の細菌叢の存在や細菌叢の経時的变化を検証する。コントロールとして健常人 15 人(予定)の腸内ならびに口腔内細菌叢を併せて検討する。また、診療で使用した末梢血の余剰を使用し、NK 細胞活性、T 細胞表面抗原等の免疫活性や切除組織標本を用いた免疫組織化学染色法にて PD-L1/PD-1 などの蛋白発現と特定の細菌叢との相関を検討する。さらに、*in vitro* では口腔扁平上皮癌細胞株を用いて、短鎖脂肪酸が免疫チェックポイント阻害関連分子の発現に及ぼす影響を検討する。

また、特定の細菌叢と生体との相互作用および病態への関与を検証し、特定の菌叢から予後を予測し、治療効果判定や選択等に応用できる新規診断方法の開発の一助となることを目的とする。

3 . 研究の方法

菌叢の特定

口腔扁平上皮癌(OSCC)患者 50 名(予定)の腸内ならびに口腔内細菌叢を治療前、治療開始後(1週間後、4週間後、12週間後、退院後6ヶ月、退院後1年)と経時的に解析し、患者における細菌叢特定の細菌叢の存在を検証する。OSCC 患者の治療前後および健常人の糞便を市販の採便キットを使用し採取する。また、口腔内プラークは滅菌綿棒を使用し、歯面より採取する。採取した検体から DNA を抽出し 16S rRNA 遺伝子領域を PCR 増幅し制限酵素による消化後フラグメント解析を行うという T-RFLP 法により細菌目から属レベルの比較的大まかな細菌群の占有率を評価する。

さらに、16S rRNA 遺伝子 V1-V2 領域をターゲットとしたプライマーで 16S 領域の PCR 増幅を行う。検体識別のため検体毎にインデックス配列を付与し、ライブラリー調整(2nd PCR)の後、PCR 産物の定量を行い、16S アンプリコンを混合・精製し、Miseq によりシーケンスを行う。16S データの情報解析を行い、多次元尺度解析法やクラスター解析により癌患者に特有な細菌叢構造や疾患特異的な細菌種を特定し、細菌が有する特徴的な機能の有無を検証する。

一連の細菌叢解析は、これまでに多くの報告がなされている V4 領域をターゲットとした 16S rRNA 解析を行い、データ解析には解析パイプラインである QIIME を使用する。

登録被験者においては、診療で使用した末梢血の余剰から NK 細胞活性、T 細胞表面抗原(CD3、CD4、CD8、CD56、CD16)を測定し、細菌叢の状態や特定の細菌が免疫能に与える影響を検討する。細胞表面抗原の検出にはフローサイトメトリー法を用いる。

特定の菌叢と生体との相互作用の検討

上記の方法により明らかとされた口腔癌患者の有する特定の細菌叢と、病態への影響メカニズムを詳細に検討するために、免疫チェックポイント機構を中心として検討する。その方法として、登録した口腔癌患者の生検時組織を使用し、口腔扁平上皮癌組織における PD-L1 ならびに PD-1 の発現を免疫組織化学的に検討し、細菌叢と免疫応答に対する関連について検討する。さらに、臨床病態や生存率との相関について検討する。さらに細菌由来の短鎖脂肪酸が扁平上皮癌細胞における PD-L1 遺伝子ならびに蛋白発現に与える影響を定量 PCR 法、WesternBlotting 法で解析する。

4 . 研究成果

現在までに、健常人と口腔癌患者において、採便キットを用いた糞便採取および滅菌綿棒を用いた口腔内プラーク採取により、腸内細菌叢および口腔内細菌叢を T-RFLP 法により解析を遂行し、多変量解析の一つである判別分析法により健常人と治療開始前の口腔癌患者間での異なる細菌叢クラスターを形成していることを明らかとした(dysbiosis)。また、治療開始後から経時的に(治療開始1週間後、4週間後、12週間後、退院後6ヶ月、退院後1年、退院後2年まで)採便と口腔内プラーク採取を行い、前年度の報告からさらに長期間の解析を進め、癌治療前後でのより長期的な細菌叢の変化を解析した。

口腔内細菌叢については、T-RFLP 法に加え、種レベルにおける口腔内菌叢の菌叢構造の差異を見出すことを目的とし、次世代シーケンサーmiseq を用いたメタ 16s 解析を実施し

た。現在までの解析の結果、健常人と口腔癌患者間で異なる菌種が存在し、種レベルで菌叢構造も異なることを多変量解析(主成分分析ならびクラスター解析)により明らかにした。T-RFLP 解析と比較検討した結果、同様の傾向を示し、メタ 16S 解析と T-RFLP 解析が高い相同性をもつことを確認した。

さらに、登録被験者においては、入院中や外来通院中などの診療で使用した末梢血の余剰から免疫関連細胞を測定し、治療開始前と治療開始後の経時的な免疫能の変化や、特定の細菌が免疫能の変化に与える影響を検討した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 松井 健作
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いた 口腔癌患者の口腔内細菌叢の多様性解析
3. 学会等名 第65回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松井 健作
2. 発表標題 口腔癌患者における腸内ならびに口腔内細菌叢の多様性解析第二報
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------