

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06296・19K21384

研究課題名（和文）口腔常在細菌定着に関わる機能の網羅的同定

研究課題名（英文）Identification of functions related to oral bacteria colonization

研究代表者

影山 伸哉（Kageyama, Shinya）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：90822495

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、口腔マイクロバイオームは生後2年頃までに急激に変化し、その菌種多様性や細菌種構成は成人に近づくことが明らかとなった。また、いくつかの細菌種においてこの時期に全く異なる動きをする菌株の存在が示唆された。本研究の結果は、口腔常在細菌の定着メカニズム解明の足がかりとなり、口腔マイクロバイオームの細菌種構成制御に新たな戦略をもたらす可能性を秘めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔マイクロバイオームが全身の健康に大きく影響することから、常在細菌定着のメカニズムを明らかにし、マイクロバイオーム形成を制御・誘導することで、疾患発症を予防することができると考えられる。本研究の結果は、常在細菌定着のメカニズム解明の基盤となり、口腔マイクロバイオームをターゲットにした新たな治療法の開発につながる点で社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that drastic compositional shifts in oral microbiota occurred by the age of 2 years and bacterial diversity and overall bacterial composition reached levels comparable to those in adults. We also found bacterial strains that belonged to same species, but showed quite different behavior in these period. These results may be helpful for elucidation of colonization mechanism of oral bacteria and preventing the development of various diseases associated with oral microbiota throughout life.

研究分野：予防歯科学

キーワード：乳幼児 口腔マイクロバイオーム 定着 成熟 16S rRNA ロングリードシーケンサー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔には膨大な数の細菌が生息し、それらが複雑で安定した常在細菌叢（マイクロバイオーム）を構築している。近年、マイクロバイオーム解析の急速な進歩によって、口腔常在マイクロバイオームがう蝕や歯周病などの口腔疾患だけでなく、肺炎や肥満、腎疾患など全身の健康にも影響していることが明らかとなってきた。その中で我々は、口腔マイクロバイオームが形成される最初の過程で口腔マイクロバイオームを健康な状態に誘導することができれば、生涯における疾患発症を未然に防ぐことができるかもしれないと考えた。

口腔は生後すぐから多様な細菌に曝されるようになり、小児の成長とともに口腔内の常在マイクロバイオームは成熟していくと考えられている。米国の研究グループは、歯の萌出前の小児（0歳児）と歯の萌出後の小児（0-5歳児）の口腔細菌叢を調べ、歯の萌出前後に劇的な細菌叢の変化が生じる可能性が高いと報告している。この時期の細菌定着の過程や細菌構成の継時的変化を理解することは、その後の口腔細菌叢の形成に重要な役割を果たすと考えられるが、いまだに十分には解明されていない。また、生後様々な細菌種に曝露されていく中で、ヒト口腔に固有の細菌種が定着することから、環境適応に必要な機能を持つ細菌種が選択的に定着していることが予想されるが、こういった機能を持つ細菌が常在細菌として定着するのか、あるいは排除されていくのか、定着に関わる口腔細菌の機能についてはほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では生後二年間の口腔細菌叢に着目し、次世代シーケンサーを用いて口腔細菌叢を縦断的に調べた。本研究の目的は、細菌構成の継時変化や成人と比較した際の特徴を明らかにすることと、口腔細菌叢のもつ遺伝子群の変化を明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究では、これまでに採取したサンプルを使用して解析を行った。主な解析対象は小児 8 名から縦断的（生後半年から約 2 年間）に採取した舌苔サンプル（一人当たり 33-88 サンプル、計 464 サンプル）で、コントロールとして健康な小児 32 名（0-2 歳児）と健康な成人 73 名（20-29 歳）から採取したサンプルも使用した。まず、これらのサンプルから抽出された DNA を鋳型とし、PCR 法を用いて細菌 16S rRNA 遺伝子の V1-V2 領域を網羅的に増幅した。プライマーにはシーケンス用のアダプター配列を付与した 338R プライマーと、アダプター配列に加え 8 塩基の検体識別用タグ配列を付与した 8F プライマーを用いた。異なるタグ配列を持つ増幅断片を等濃度ずつ混合（最大 192 サンプル）した後、その塩基配列を次世代シーケンサーの Ion PGM（Thermo Fisher Scientific 社）を用いて解読した。解読した塩基配列から、R スクリプトを用いて低品質の配列（断片長、クオリティスコア、プライマー配列の有無、ホモポリマーの有無などで確認）を除外し、高品質の配列のみを選別した。得られた高品質の配列を UPARSE を用いて Operational Taxonomic Unit (OTU、解析操作上の菌種) に分類し、各サンプルに含まれる細菌種の多様性や構成比率、予測される遺伝子群を明らかにした。細菌種の推定には Human Oral Microbiome Database (HOMD) の配列データと RDP classifier を用いた。また、サンプルに含まれる遺伝子群の予測には PICRUST を使用し、判別分析には LEfSe を使用した。

細菌種の推移をより詳細に解析するため、本研究では 16S rRNA 遺伝子全長の解析も行った。縦断サンプルの中から生後 26-28 週と生後 84-85 週のサンプルのみを選別し、PCR 法を用いて rRNA 遺伝子の全長を網羅的に増幅した。リバースプライマーには、338R の代わりに 1492R を用いた。異なるタグ配列を持つ増幅断片を等濃度ずつ混合した後、その塩基配列をロングリードシーケンサーの PacBio Sequel (Pacific Bioscience 社) を用いて解読した。解読した塩基配列から断片長やプライマー配列の有無などに基づき低品質の配列を除外し、高品質の配列のみを選別した。得られた高品質の配列のエラー補正を行った後、HOMD の配列データと RDP classifier を用いて、各サンプルに含まれる細菌種とその構成比率を決定した。

4. 研究成果

各被験児の口腔 MB の細菌種多様性（検出 OTU 数）の推移を確認したところ、菌種多様性は生後 80 週頃までに急激に増加していた（図 1）。コントロールの小児サンプルでも同様の増加傾向が認められた。そこで、生後 10-29 週を EEP (early exponential phase)、生後 80-120 週を TP (transitional phase) と定義し、その期間のサンプルの菌種多様性を成人と比較した。全ての被験児において TP の菌種多様性は EEP と比較して有意に高くなっていったが、一方で成人の菌種多様性と

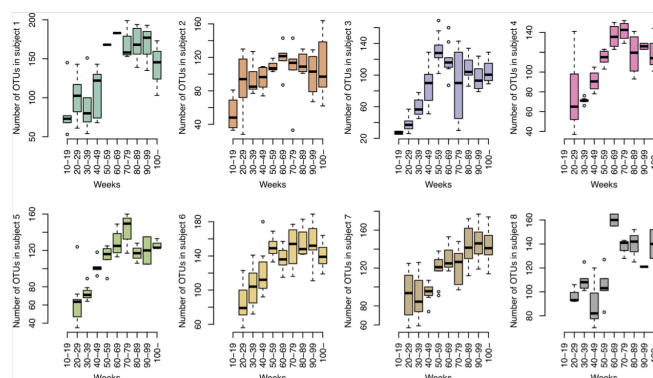


図1 各被験児の菌種多様性（検出OTU数）の推移

比較すると、ほとんどの被験児で TP は成人と同じか、やや高い値を示していた。このことから、菌種多様性は生後 2 年前後ですでに成人と同じ水準に達していることが示唆された。

次に、各群 (EEP、TP、成人) の細菌種構成の類似度を、UniFrac 距離を用いた種座標分析によって確認した。その結果、EEP、TP ともに成人の細菌種構成とは異なっていたが、TP は EEP より成人により類似していることが明らかとなった (図 2A)。また各被験児ごとにみても、ほとんどの被験児で同様の結果が確認された (図 2B)。このことから、生後 2 歳頃の細菌種構成は生後半年頃より成人に近くなっており、生後半年頃から生後 2 歳頃までの 1 年半に生じる急激な変化は、生後 2 歳頃から成人までの約 20 年で生じる変化よりも大きいことが示唆された。また、同一被験児内で比較した EEP と TP より、他人である成人と TP の方が類似していることから、EEP と TP の間に生じる変化は個体差を超えて大きいことが示唆された。

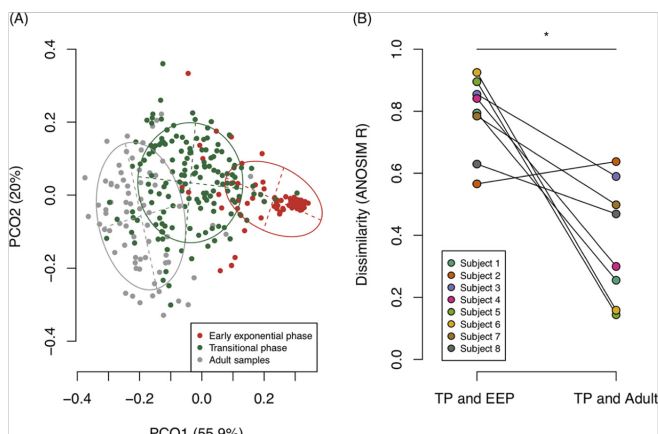


図2 (A) 各サンプルの細菌構成の類似度関係 (B) 各被験児と成人との類似度関係

そこで、各群でどのような細菌種が優勢かベン図を用いて確認した。EEP では *Streptococcus peroris* や *Streptococcus lactarius* が優勢で、TP 以降では *Porphyromonas pasteri* や *Granulicatella adiacens*、*Fusobacterium periodonticum* などが優勢だった (図 3)。また、*Neisseria flavescens* や *Prevotella melaninogenica*、*Rothia mucilaginosa* などは EEP から成人までに共通して高い構成比率を占めていた (Core OTUs)。EEP と TP、あるいは EEP と成人で共通して優勢だった細菌種は Core OTUs 以外には存在せず、一方で TP と成人では Core OTUs に加えてさらに 10 菌種が共通して優勢だったことから、上記の結果を支持する結果となった。これらの細菌種の構成比率の推移をみると、EEP で優勢だった細菌種 (EEP-OTUs) は 30-49 週頃に急激に減少し、それとは逆に TP 以降で優勢だった細菌種 (TP-Adult common OTUs) はその時期に増加していた (図 4)。このことから、口腔 MB はいくつかの細菌種が入れ替わりながら成熟していくことが示唆された。

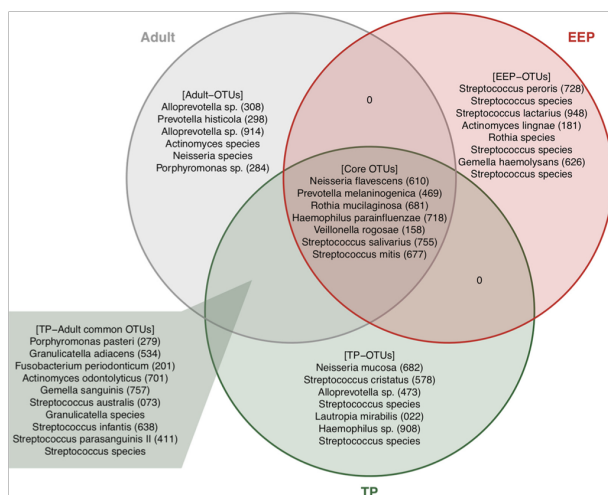


図3 主要なOTU (平均構成比率1%以上) の分布

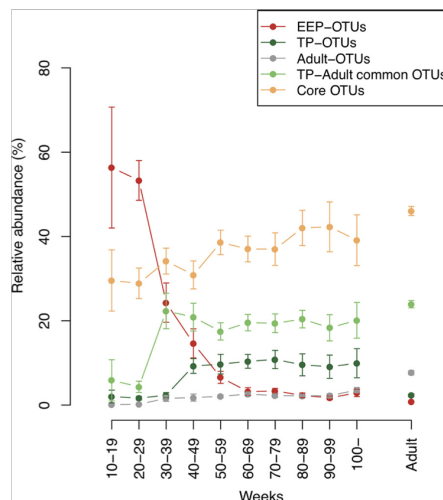


図4 主要なOTUの構成比率の推移

我々は、PICRUSt を用いて EEP と TP サンプル中の遺伝子群を予測し、各群に特徴的な遺伝子の同定を試みた。その結果、EEP では膜輸送や糖代謝に関わる遺伝子群が高い割合を示し、TP ではリポ多糖合成やアルギニン、プロリン代謝に関わる遺伝子が高い割合を示していたが、細菌構成の変化と比較して劇的に差がある遺伝子は認められなかった (図 5)。

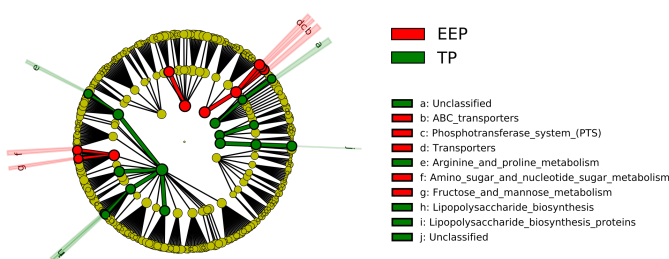


図5 各群で特徴的な予測遺伝子

そこで我々は異なるアプローチとして 16S rRNA 遺伝子全長の塩基配列解読を行い、この時期の細菌種をより精密に解読した。その結果、16S rRNA 遺伝子の V1-V2 領域のみを用いた上記の解析では一種類とされていた菌種が、わずかに塩基配列が異なる数種類にさらに細分化された。詳しくみると、EEP から成人まで連続的に検出されると示唆されていた *Streptococcus salivarius* や *R. mucilaginosa* のなかに、変化後に検出されなくなるものや変化後から検出されるようになるものが存在することが明らかとなった。つまり、乳幼児期の口腔において同じ菌種でも全く異なる動きをする菌株が存在することが示唆された。これらの菌はほとんど同じ遺伝子を持つことが予想されるため、今後これらの持つ遺伝子群を比較することで、口腔への常在細菌定着に関与する遺伝子のより効率的な同定が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kageyama S, Asakawa M, Takeshita T, Ihara Y, Kanno S, Hara T, Takahashi I, Yamashita Y	4. 巻 4
2. 論文標題 Transition of Bacterial Diversity and Composition in Tongue Microbiota during the First Two Years of Life	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00187-19	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 Kageyama S, Takeshita T, Takeuchi K, Asakawa M, Matsumi R, Furuta M, Shibata Y, Nagai K, Ikebe M, Morita M, Masuda M, Toh Y, Kiyohara Y, Ninomiya T, Yamashita Y	4. 巻 10
2. 論文標題 Characteristics of the Salivary Microbiota in Patients With Various Digestive Tract Cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2019.01780	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 山下喜久、影山伸哉	4. 巻 49
2. 論文標題 舌苔細菌叢と誤嚥性肺炎	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 感染症	6. 最初と最後の頁 -
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 -

1. 著者名 竹下徹、影山伸哉、山下喜久	4. 巻 49
2. 論文標題 嚥下されている口腔常在微生物叢の構成と健康状態との関連	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本嫌気性菌感染症学会雑誌	6. 最初と最後の頁 51-55
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7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kageyama S, Takeshita T, Asakawa M, Matsumi R, Takeuchi K, Nagai K, Morita M, Masuda M, Toh Y, Ninomiya T, Kiyohara Y, Yamashita Y
2. 発表標題 Association of Oral Microbiota with Digestive Tract Cancers
3. 学会等名 The 97th IADR General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kageyama S
2. 発表標題 Identification of distinct bacterial species in the salivary microbiota of digestive tract cancer patients
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 影山伸哉、竹下徹、竹内研時、朝川美加李、古田美智子、柴田幸江、山下喜久
2. 発表標題 消化管がん患者の唾液マイクロバイオーームに特徴的な細菌種の同定
3. 学会等名 第69回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古田美智子、竹内研時、竹下徹、須磨紫乃、影山伸哉、朝川美加李、奥菜央理、黒江慧、高尾直宏、柴田幸江、山下喜久
2. 発表標題 小学校でのフッ化物洗口の経験と成人のう蝕との関係
3. 学会等名 第41回九州口腔衛生学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamashita Y, Kageyama S, Asakawa M, Takeshita T, Ihara Y, Kanno S, Hara T, Takahashi I
2. 発表標題 A PROSPECTIVE COHORT STUDY FOR THE DEVELOPMENT OF ORAL MICROBIOTA IN INFANCY
3. 学会等名 The 7th World Congress on Targeting Microbiota (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshita T, Kageyama S, Asakawa M, Shibata Y, Yamashita Y
2. 発表標題 Identification of initial colonizing bacteria in dental plaques from young adults using full-length 16S rRNA gene sequencing
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 影山伸哉、竹下徹、朝川美加李、柴田幸江、山下喜久
2. 発表標題 乳幼児の口腔マイクロバイオームの多様性と細菌構成の経時変化
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
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
---------	---------------------------	-----------------------	----