

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03901

研究課題名(和文) 早期ライフステージにおける口腔マイクロバイオーム形成に影響を及ぼす因子の解明

研究課題名(英文) Elucidation of factors affecting oral microbiome development in early life stage

研究代表者

山下 喜久 (Yamashita, Yoshihisa)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：20192403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：生後4か月の乳児期とその母親の検体を含めた計645検体を同時に解析した結果、4か月児では舌苔細菌叢は極めてシンプルであり、大きく8つのクラスターに分かれた。1歳6か月児の時点で細菌叢の多様性が急速に増加し、成人の細菌叢構成に大きく近づき、一部乳児様の細菌叢構成を示す者がいる一方で、大部分は我々が過去に定義した不健康な状態に関連するタイプ1様および健康な状態に関連するタイプ2様に大別できた。しかし、乳児期の細菌叢の8つのクラスターは幼児期のタイプ1様あるいはタイプ2様とはとくに有意な関連性を示さなかった。一方、食生活がタイプ1様あるいはタイプ2様の舌苔細菌叢の形成に関連することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管の粘膜上皮には人体中で最も豊富な種類と量の細菌種からなるマイクロバイオームが構築され、そのバランスが崩壊したdysbiosisは様々な疾患の原因となる。口腔マイクロバイオームは口腔疾患だけでなく、全身の健康維持にも影響することが知られるようになり、口腔マイクロバイオーム制御の重要性は年々増している。本研究では、早期ライフステージにおける口腔マイクロバイオームの成り立ちとその要因および健康との関連性を解明し、その成果から口腔マイクロバイオームを効率的に制御するための貴重な情報を提供している。

研究成果の概要(英文)：Microbiome analyses of a total of 645 specimens, including those from 4-month-old infants and their mothers, revealed that the tongue coating flora of 4-month-old infants was extremely simple and divided into eight clusters. At 1 year and 6 months of age, the diversity of the microbiota increases rapidly, approaching the adult microbiota composition greatly, with some exhibiting an infantile-like microbiota composition. While the majority, it was roughly divided into type 1 related to unhealthy conditions and type 2 related to healthy conditions as defined in the past. However, the eight clusters of infant microbiota did not show any significant association with infant type 1-like or type 2-like. On the other hand, it was suggested that dietary habits are related to the formation of type 1-like or type 2-like tongue coating flora.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：口腔マイクロバイオーム 早期ライフステージ ディスバイオシス 次々世代ロングリードシーケンス
AI

1. 研究開始当初の背景

口腔から直腸に至る消化管の粘膜上皮には温度、湿度、栄養状態などの好条件から人体中で最も豊富な種類と量の細菌種からなるマイクロバイームが構築される。同じ消化管でも部位によって細菌種構成は様々であり、各部位に特徴的な構成を示す。その構成バランスは宿主の健康維持に重要であり、そのバランスが崩壊した *dysbiosis* は様々な疾患の原因となる。多くの研究から潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患が腸内マイクロバイームの *dysbiosis* によることが明らかにされており、プロバイオティクスや便移植などによる治療方法が考案されている。その他にも、肥満、大腸癌、肝癌、循環器疾患さらには自閉症も腸内マイクロバイームの *dysbiosis* と関連するとの報告があり、近年マイクロバイーム研究への関心が急速に高まっている。

口腔は消化管の一部であり、口腔マイクロバイームには腸内と同様に *Bacteroidetes* 門や *Firmicutes* 門が優勢であるが、健康な腸管にはほとんど認められない *Streptococcus* 属 (*Firmicutes* 門) の細菌種や *Fusobacteria* 門、*Proteobacteria* 門、*Actinobacteria* 門の細菌種なども高い比率を占めており、口腔マイクロバイームはより複雑な構成を示す。最近では、口腔マイクロバイームは齲蝕や歯周病などの口腔疾患だけでなく、全身の健康維持にも影響することが知られており、2012 年には主に癌患者の術前後を対象とした口腔機能管理料や専門的口腔衛生処置が歯科診療報酬として設定されている。2018 年度の診療報酬改定では口腔機能管理の対象が周術期から周術期等に拡大され、その目的に「口腔内細菌による合併症の予防」が明記されるなど、口腔マイクロバイーム制御の重要性は年々増している。しかし、顕著な効果を発揮する口腔マイクロバイーム制御手段は現段階では機械的清掃による量の低減に限られており、質を制御するための科学的アプローチは進んでいない。

近年、次世代シーケンサーの飛躍的な進歩により、マイクロバイーム研究が急速に進展し、数百種の細菌構成比率を比較的容易に把握できるようになり、これまでの病原細菌に加えてそれを取り巻く口腔マイクロバイーム全体像を含めて、口腔ならびに全身に対する病原性の意味を考える時代を迎えている。本研究は 700 名規模の大集団から得られる多種多彩な情報を NEC ソリューションイノベーション株式会社が保有する解釈性の高い WhiteBox 型の Artificial Intelligence (AI) を駆使して、早期ライフステージにおける口腔マイクロバイームの成り立ちとその要因および健康との関連性を解明し、その成果から口腔マイクロバイームを効率的に制御するための貴重な情報の取得を目指す。

2. 研究の目的

ヒトマイクロバイーム解析は、口腔内に比べ腸内の解析が先行しており、世界的に見ても腸内マイクロバイーム研究に比べて口腔 *dysbiosis* の成立機序の解明はほとんど進んでいない。その理由の一つに、口腔マイクロバイームの動物実験モデルの構築が難しいことがあり、交絡因子などの問題はあがるが、大規模集団を対象としたヒトのデータからそのメカニズムの解明に挑む疫学研究が不可欠である。

申請者は、長年に亘って進められている久山町コホート研究に参画し、医科歯科連携により口腔と全身の健康の関連性を解明する疫学研究にこれまでに携わってきた。本申請研究では、比較的単純な定着初期から口腔マイクロバイームが複雑に成熟する過程に焦点を絞って、宿主と口腔細菌の相互作用から生み出される口腔 *dysbiosis* の形成機序を可及的に単純化して解析を試みる発想をこれまでの多くの疫学研究の経験から着想した。

さらに、複雑マイクロバイーム解析に AI を用いた解析を応用することで、与えられたパラメータから複数の規則性を AI が自動的に発見することによって、これまでの通常の統計学手法の解析限界を超えて口腔マイクロバイームと健康との関連性を明らかにできる。本研究は、医学的見地も含めた総合的な観点から、口腔マイクロバイームの形成機序とその制御、さらには口腔 *dysbiosis* が健康に及ぼす影響の解明を試みる斬新な分子疫学であり、これまでになく成果が期待される。

3. 研究の方法

令和 2 年 1 月から 3 月に福岡市東区保健所の 4 か月児健診を受診した乳児とその母親を対象として、母子から採取した舌苔試料のマイクロバイーム解析を実施し、その後 1 歳 6 か月歯科健診および 3 歳児歯科健診の受診時にも同一の被験者を追跡して舌苔試料を採取し、舌苔マイクロバイーム解析を進めた。この結果生後 4 か月から 3 歳までの舌苔マイクロバイーム解析結果の変化や生活習慣や健康状況との関連を解析することで、口腔 *dysbiosis* の成立機序の解明を行った。

まず始めに舌苔マイクロバイーム解析として次世代シーケンサー Ion PGM による予備実験をおこなった。舌苔試料の品質を確認した後、採取した試料から DNA を抽出し、PCR 法を用いて細菌 16S rRNA 遺伝子の V1-V2 領域を増幅し、Ion PGM を用いてその塩基配列を解読した。さらに、それに続きロングリードシーケンサーの PacBio SequelII を用いたより詳細な解析を行った。採取した全試料から抽出された DNA を鋳型とし、PCR 法を用いて細菌 16S rRNA 遺伝子の全長 (V1-V9 領域) を増幅した後、PacBio SequelII にて増幅断片の塩基配列を高精度に同定し、各試料の中の細菌構成を詳細に同定した。

これらのマイクロバイーム解析結果とアンケート調査に基づいて実施した生後4か月、1歳6か月、3歳の時点での乳幼児の生活習慣ならびに健康状況との関連性の統計的解析を行った。

4. 研究成果

解読した塩基配列をもとに各試料中の細菌構成を明らかにしたところ、母親の舌苔マイクロバイームは乳児と比較して菌種多様性(検出菌種数、Shannon index、Phylogenetic diversity など)が有意に高く、その細菌構成も大きく異なっていた (ANOSIM P value <0.001)。また、乳児の舌苔では乳児特異的な細菌種(*Streptococcus peroris* など主に *Streptococcus* 属の細菌種)が高い比率を占めていた。これらの結果は過去の報告とも一致しており、サンプリングに問題はなく舌苔試料の品質は十分であることが確認された。

さらに、本研究開始前年度に既に採取していた4か月児と母親の舌苔試料と、健康診査票や質問紙票から得られた情報をもとに、4か月児と母親における口腔細菌の母子伝播について詳細な解析を行った結果、4か月児の細菌構成は母親の細菌構成と大きく異なっていた。しかし、4か月児に検出された ASV 数の中央値 16.7%(0-75%)が生物学的母親と共有されており、共有された ASV が全体の構成比率の 9.7%(0-99.3%)を占めていた(範囲)。この構成比率は、分娩様式や抗菌薬服用の有無とは有意な関係を示さなかったが、乳児の栄養方法とは強い関連を示した。具体的には完全母乳栄養児と比較して人工乳栄養児で有意に高かったことから、母乳栄養によって乳児特有のマイクロバイームが維持される可能性が示唆された。

さらに初年度から次年度にかけて、令和3年3月から5月実施の福岡市東区の1歳6か月児健診の場で口腔診査ならびに舌苔採取の追跡調査を実施し、健康診査票と質問紙票から情報の取得を行った。COVID-19の影響で1歳6か月児健診を集団健診ではなく、個人開業医での個別健診として実施することになり追跡調査ができなくなることが危ぶまれたが、九州大学が独自に集団健診を実施する許可を福岡市から得たことで、216名の追跡調査が可能となった。採取した舌苔試料からDNAを抽出したのち、PCR法を用いて細菌16S rRNA 遺伝子の全長(V1-V9領域)を増幅し、PacBio Sequel IIを用いてその塩基配列を解読した。その後、解読した塩基配列をもとに各試料中の細菌構成を詳細に明らかにした。216名から採取した舌背スワブサンプルより口腔細菌叢のDNAを抽出して、PacBio sequelを用いた16S rRNA 遺伝子の全長解析を令和4年度内に完了した。

この216名について生後4か月の乳児期とその母親の検体を含めた計645検体を同時に解析し、その類似度や関連性について明らかにした。その結果、4か月児の時点では舌苔細菌叢は極めてシンプルな細菌叢構成であり、大きく8つのクラスターに分かれた。これに対し、1歳6か月児の時点では細菌叢の多様性が急速に増加し、成人の細菌叢構成に大きく近づき、一部乳児様の細菌叢構成を示す者がいる一方で、大部分は成人の細菌叢のように我々が過去に定義した不健康な状態に関連するタイプ1様および健康な状態に関連するタイプ2様に大別できた。しかしながら、乳児期の細菌叢の8つのクラスターはタイプ1様あるいはタイプ2様とはとくに有意な関連性を示さなかったことから、乳児期の細菌叢はその後の細菌叢の成育にはとくに影響を及ぼさないと考えられる。一方で、他の生活要因と1歳6か月児の舌苔細菌叢の関係を調べると食生活がタイプ1様あるいはタイプ2様の舌苔細菌叢の形成に関連することが示唆された。現在、他の生活因子も考慮して1歳6か月児の舌苔細菌叢形成に影響を与える因子の解明を試みている。

3歳児歯科健診時に採取した試料については、研究期間内に解析を終了することができなかったが、研究期間最終年度末に研究代表者が定年退職後は研究分担者である古田美智子准教授と影山伸哉助教にその後の解析を委託しており、4か月児から3歳児にかけての解析結果を総合的に分析した結果を近い将来公表する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Ma J, Furuta M, Uchida K, Takeshita T, Kageyama S, Asakawa M, Takeuchi K, Suma S, Sakata S, Hata J, Sohn W, Ninomiya T, Yamashita Y.	4. 巻 49
2. 論文標題 Yogurt product intake and reduction of tooth loss risk in a Japanese community	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Periodontol.	6. 最初と最後の頁 345-352
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcpe.13593	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, Furuta M, Takeshita T, Ma J, Asakawa M, Yamashita Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 High-Level Acquisition of Maternal Oral Bacteria in Formula-Fed Infant Oral Microbiota	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e0345221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mbio.03452-21	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0件

〔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	石村 匡崇 (Ishimura Masataka) (10448417)	九州大学・医学研究院・講師 (17102)	
研究分担者	竹内 研時 (Takeuchi Kenji) (10712680)	九州大学・歯学研究院・共同研究員 (17102)	

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
研究分担者	古田 美智子 (Furuta Michiko) (20509591)	九州大学・歯学研究院・講師 (17102)	
研究分担者	竹下 徹 (Takeshita Toru) (50546471)	九州大学・歯学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	須磨 紫乃 (Suma Shino) (70759365)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	影山 伸哉 (Kageyama Shinya) (90822495)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	朝川 美加季 (Asakawa Mikari) (90852583)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	

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