

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09932

研究課題名(和文) 化学療法による口腔粘膜炎における口腔細菌叢とIgA抗体応答性の関与

研究課題名(英文) IgA response associated with the oral microbiota of chemotherapy-induced oral mucositis.

研究代表者

小越 菜保子 (kato-kooge, nahoko)

大阪医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：60509115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は造血器腫瘍患者の化学療法に伴う口腔環境の変化において、口腔粘膜の恒常性の維持に重要な口腔細菌叢さらにIgA抗体応答性に着目し、口腔粘膜炎の病態との関連を明らかにすることを目的とした。その結果、造血器悪性腫瘍患者における化学療法の開始に伴う口腔細菌叢の変化を特徴づけ、口腔粘膜炎に関連する口腔細菌叢の特徴を明らかにした。さらに、口腔内のIgA抗体応答性が口腔細菌叢と関連する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔細菌叢は、全身状態と関連することが近年明らかになってきている。口腔細菌叢を規定する要因の一つとして宿主の免疫応答性、なかでも口腔のIgA抗体応答性が関連する可能性を明らかにしたことは、学術的意義がある。本研究の結果、口腔粘膜炎のような化学療法に伴う有害事象の病態を理解するためには、口腔細菌叢に注目することが重要であることが示唆された。これらの知見は、化学療法を受ける患者の有害事象の予測、予防、改善に大きく貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the association between chemotherapy-induced oral mucositis in patients with hematopoietic tumors and oral microbiota and IgA antibody response, which are important for maintaining oral mucosal homeostasis. As a result, we characterized changes in the oral microbiota associated with the initiation of chemotherapy in patients with hematopoietic malignancies, and clarified the characteristics of the oral microbiota associated with oral mucositis. Furthermore, we suggested that oral IgA antibody responsiveness may be associated with oral microbiota.

研究分野：口腔微生物学, 口腔免疫学

キーワード：口腔細菌叢 IgA抗体 化学療法 口腔粘膜炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の化学療法による合併症のひとつである口腔粘膜炎は、重大な痛み、栄養不足、入院期間の延長、血流感染、抗腫瘍薬の投与量削減に関連するため、最適な治療の実施を妨げる要因となり、臨床上問題となる。治療前から口腔ケアを行うことで口腔粘膜炎が軽減するが、そのメカニズムは明らかでない。口腔粘膜炎は化学療法剤の口腔上皮に対する細胞傷害性が引き金となって発症するが、その感受性には口腔環境、中でも細菌学的要因と宿主の免疫応答性が強く関わることが示唆されている (Vasconcelos RM. *et al.*, *J Dent Res*, 2016)。

口腔粘膜には常在菌が存在し、また常に外界からの病原菌にさらされている。健康な状態では常在菌と共生し病原菌を排除することによって恒常性が維持され口腔細菌叢が安定している。化学療法による口腔環境の変化が口腔細菌叢と宿主の応答性に影響を及ぼし、口腔粘膜炎の感受性に影響を及ぼす可能性があるがその詳細は明らかでない。

近年の細菌叢研究の進展により、細菌と生体の共生関係が様々な疾患、健康状態に関わることがわかってきた。また、粘膜組織の免疫応答の主役である免疫グロブリン A (IgA) が細菌叢の維持に重要であるという知見が増え (Okai S. *et al.*, *Nat Microbiol*. 2016)、注目されている。腸内細菌の多くが病原菌のみでなく常在菌も IgA 抗体が結合 (コーティング) した状態で存在している (Bunker JJ. *et al.*, *Science*. 2017)。IgA 抗体には高親和性の抗原特異的 IgA 抗体と低親和性の poly-reactive IgA 抗体の 2 種類が存在する。後者の poly-reactive IgA 抗体は、感染や特定の抗原に対する免疫応答が行われない場合でも定常的に産生されることで、常在細菌叢の維持に貢献するとされている (Breedveld A. *et al.*, *Front Immunol*. 2019)。口腔内に分泌される IgA 抗体も口腔細菌叢を宿主にとって適切に保ち、健康な口腔環境を維持するために、重要な役割を果たしている可能性があるが知見はほとんどない。

本研究は、白血病、リンパ腫、骨髄腫などの造血器腫瘍に対する化学療法に伴う口腔環境の変化において、口腔粘膜の恒常性の維持に重要な口腔内細菌叢さらに IgA 抗体応答性に着目する。造血器腫瘍とその化学療法により免疫応答性が低下した状態では、恒常性バランスが崩れ、細菌との共生関係の乱れが生じることが想定される。これらの指標として口腔内細菌叢および IgA 抗体応答性の変化を評価し、口腔粘膜炎の発症、増悪などの感受性を規定する因子となりうるかどうかを検証する。これらの臨床的検証は、口腔粘膜炎の予測、予防に繋がる基礎的データとなると考える。

### 2. 研究の目的

本研究は造血器腫瘍患者の化学療法に伴う口腔環境の変化において、口腔粘膜の恒常性の維持に重要な口腔細菌叢さらに IgA 抗体応答性に着目し、口腔粘膜炎の病態との関連を明らかにすることを目的とした。造血器腫瘍そのものだけでなく化学療法に起因する免疫応答性の低下は、口腔環境を変え、重篤な口腔粘膜炎の発症および増悪と関連する可能性がある。そこで、造血器腫瘍患者の化学療法前後の口腔細菌叢および IgA 抗体応答性の変化を評価し、口腔粘膜炎の病態との関連を検証する。

### 3. 研究の方法

(1) 口腔サンプルの採取：対象者は、造血器腫瘍のうち、リンパ腫、白血病、骨髄腫の化学療法開始前に周術期口腔管理を目的に歯科口腔外科に紹介された患者のうち、全身疾患のない初めて化学療法を受ける患者とした。本学の研究倫理委員会承認 (承認番号：2145) のもと、十分な説明を行った上で口腔サンプルを採取し、口腔および全身状態の情報をカルテから得た。サンプル採取は、我々が以前に報告した含嗽法 (Omori M. *et al.*, *Clin Oral Investig*. 2021) で行い、化学療法開始前と、開始後の 2 回行った。

(2) 口腔細菌叢の解析：口腔サンプルの 16S rRNA メタゲノム解析を行った。すなわち、細菌 DNA を抽出、16S rRNA 遺伝子 V1-V2 領域を PCR 増幅後、次世代シーケンサー (Miseq®: イルミナ社製) にて解析した。シーケンスデータを用いて、比較分析および線形判別分析効果量 (LEfSe) 解析により、化学療法開始前後および口腔粘膜炎を発症した患者における特徴的な細菌群を検索した。

(3) IgA 抗体応答性の解析：口腔内の sIgA 濃度は ELISA によって定量した。口腔細菌叢に対する口腔内 IgA 抗体応答性を評価するために、口腔サンプル内の IgA 抗体結合細菌と非結合細菌を IgA 特異 PE 標識抗体および MACS システム (Miltenyi Biotec) の PE 磁気ビーズを使用して分離し、(2)の方法で 16S rRNA メタゲノム解析を行った (IgA-Seq)。シーケンスデータを用いて、主要な細菌属の IgA 結合度を結合指数によって評価し、化学療法開始および口腔粘膜炎発症と口腔サンプル中の IgA 抗体応答性の関連を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 化学療法開始に伴う口腔細菌叢の変化

化学療法開始前後の口腔細菌叢の多様性の違い

多様性の解析から、化学療法開始前群と比較して後群では、口腔細菌の豊富さや均等性有

意に低下していた (OTU 指数:  $p < 0.001$ , Shannon 指数:  $p < 0.001$ )。多様性を示す UniFrac 解析に基づく unweighted と weighted の UniFrac distance による PCoA は, 個人差はあるものの, 細菌叢は化学療法前群と後群間で異なることを示した。この違いは PERMANOVA で確認された (unweighted UniFrac distance:  $p = 0.001$ , weighted UniFrac distance:  $p = 0.001$ )。

#### 化学療法開始前後で存在比率の異なる口腔細菌

化学療法開始前後で存在比率の異なる口腔細菌を LEfSe 解析によって同定した。属レベルでは, 化学療法開始前群では *Streptococcus*, *Prevotella* 7, *Neisseria* などが多く, 後群では *Staphylococcus* および *Rothia* などが多かった。これらの結果から, 化学療法開始前と後では口腔内に有意に異なる細菌群が存在することが明らかになった。

#### 化学療法開始前後の特定の細菌群の存在比率の変化

25 の細菌属が, 化学療法の開始前後でその存在比率に有意な変化を示した (RM ANOVA 検定,  $p < 0.01$ )。 *Streptococcus*, *Neisseria*, *Fretibacterium*, *Kingella* などの一部の属は, 多くの対象者で存在比率の減少を示した。一部の対象者でしか検出されないが, 化学療法開始後, 存在比率が減少した細菌属 (*Filifactor*, *Aggregatibacter*, *uncltured eubacteriumu E1-K9* など) および, 一部の対象者でしか検出されないが, 化学療法開始後に有意に存在比率が増加した属 (*Staphylococcus* と *Pseudomonas* など) の変化を確認した。

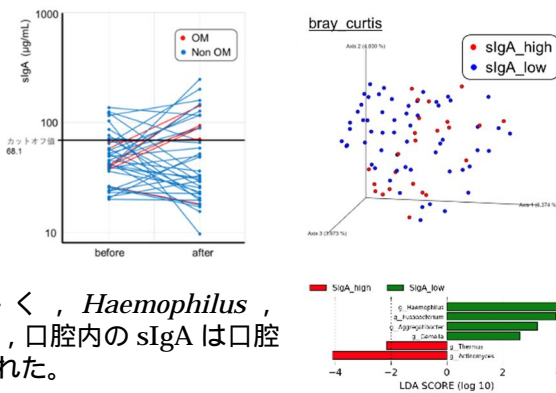
### (2) 化学療法開始後に口腔粘膜炎を発症した患者の口腔細菌叢

化学療法開始後に口腔粘膜炎を発症した患者群 (OM) としなかった患者群 (NonOM) の間で, 化学療法開始前と開始後のそれぞれにおける細菌組成を比較した。化学療法開始前後の細菌叢組成の変化は, OM 群と NonOM 群の間で違いはみられなかった。化学療法開始前には, OM 群は NonOM 群よりも OTU 指数が低かった ( $p = 0.043$ )。OM 群と NonOM 群の多様性も異なる傾向があった (unweighted UniFrac distance:  $p = 0.052$ , weighted UniFrac distance:  $p = 0.088$ )。一方, 化学療法開始後は, OM 群と NonOM 群の間で口腔内細菌叢の組成に有意な違いはみられなかった。

LEfSe 解析の結果, 化学療法開始前, OM 群は NonOM 群に比べ, *Streptococcus* と *Corynebacterium* の存在比率が少なく, *Veillonella* が多かった。化学療法開始後, NonOM 群では OM 群と比較して *Stomatobaculum* の存在比率が多かった。

### (3) 口腔内 sIgA 濃度

化学療法開始前後で口腔内 sIgA 濃度の変化に一定の傾向はみられなかったが, 口腔粘膜炎を発症した患者では, 化学療法開始後に sIgA 濃度が高くなる傾向があった。sIgA 濃度の高い群 (sIgA\_high) と低い群 (sIgA\_low) の口腔細菌叢構成を比較したところ, 異なる傾向があった (OTU 指数:  $p = 0.067$ , Bray curtis:  $p = 0.082$ )。LEfSe 解析の結果, sIgA\_high 群では *Actinomyces* などが多く, *Haemophilus*, *Fusobacterium* などが少なかった。したがって, 口腔内の sIgA は口腔細菌叢構成に影響を及ぼしうる可能性が示唆された。

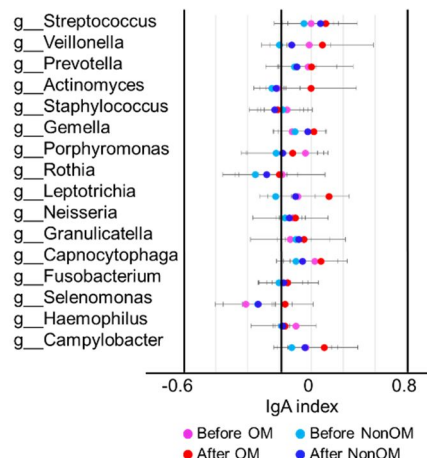


### (4) 口腔内 IgA 抗体応答性

口腔細菌叢に対する口腔内 IgA 抗体応答性を評価するために, 結合指数を用いて主要な細菌属の IgA 結合度を比較したところ, 細菌によって IgA 結合度は異なり, 一部の細菌 (*Actinomyces*, *Rothia*, *Selenomonas* など) に対する IgA 結合は弱かった。

化学療法の開始前後を比較すると, IgA 結合度は開始後に高く, さらに, 口腔粘膜炎を発症した患者群 (OM) では発症していない患者群 (NonOM) と比較して, IgA 結合度が高い傾向があった。これらの結果は, 口腔内の IgA 抗体応答性は細菌によって異なり, 化学療法によって変化すること, 口腔粘膜炎の病態と関連する可能性があることを示唆している。

以上より, 造血器悪性腫瘍患者における化学療法の開始に伴う口腔細菌叢の変化を特徴づけ, 口腔粘膜炎に関連する口腔細菌叢の特徴を明らかにした。さらに, 口腔内の IgA 抗体応答性が口腔粘膜炎と関連する可能性が示唆された。今後さらに症例数を増やし, 口腔内の IgA 抗体応答性に影響を与える因子の解明や, IgA 抗体応答性と口腔粘膜炎との関連についてさらに詳細な検討を行ってきたい。これらの知見は, 化学療法を受ける患者の有害事象の予測, 予防, 改善に貢献するものと考えられる。



口腔細菌叢において平均細菌構成比率が 1% 以上の細菌属の IgA index (IgA+細菌は正, IgA-細菌は負の値) の平均値 ± 標準偏差 (n=6) を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Omori Michi, Kato-Kogoe Nahoko, Sakaguchi Shoichi, Fukui Nozomu, Yamamoto Kayoko, Nakajima Yoichiro, Inoue Kazuya, Nakano Hiroyuki, Motooka Daisuke, Nakano Takashi, Nakamura Shota, Ueno Takaaki	4. 巻 25
2. 論文標題 Comparative evaluation of microbial profiles of oral samples obtained at different collection time points and using different methods	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 2779 ~ 2789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-020-03592-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 -

1. 著者名 Omori Michi, Kato-Kogoe Nahoko, Sakaguchi Shoichi, Komori Eri, Inoue Kazuya, Yamamoto Kayoko, Hamada Wataru, Hayase Tomoyoshi, Tano Tomoyuki, Nakamura Shota, Nakano Takashi, Une Hidenori, Ueno Takaaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Characterization of Oral Microbiota Following Chemotherapy in Patients With Hematopoietic Malignancies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Integrative Cancer Therapies	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) 10.1177/15347354231159309	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10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大森実知, 小越菜保子, 福居希, 越智文子, 山本佳代子, 寺井陽彦, 早瀬友克, 田野智之, 宇根秀則, 植野高章.
2. 発表標題 造血器腫瘍患者の化学療法によるOral Microbiotaの変化に関するメタゲノム解析
3. 学会等名 第65回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 Michi Omori, Nahoko Kato-Kogoe, Eri Komori, Ayako Ochi, Haruhiko Terai, Wataru Hamada, Tomoyoshi Hayase, Tano Tomoyuki, Une Hidenori, Takaaki Ueno
2. 発表標題 The alterations in oral microbiota of hematopoietic tumor patients during chemotherapy
3. 学会等名 The 2nd Annual Meeting of the International Society of Oral Care (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大森 実知, 小越 菜保子, 古森 亜里, 濱田 渉, 早瀬 友克, 田野 智之, 宇根 秀則
2. 発表標題 造血器腫瘍患者の化学療法による口腔細菌叢の変化
3. 学会等名 第19回日本口腔ケア学会総会・学術大会
4. 発表年 2022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	植野 高章 (Ueno Takaaki) (60252996)	大阪医科薬科大学・医学部・教授  (34401)	
研究分担者	大森 実知 (Omori Michi) (60803137)	大阪医科薬科大学・医学部・助教  (34401)	
研究分担者	寺井 陽彦 (Terai Haruhiko) (70207471)	大阪医科薬科大学・医学部・非常勤医師  (34401)	
研究分担者	大山 秀樹 (Ohyama Hideki) (90280685)	大阪医科薬科大学・医学部・非常勤講師  (34401)	

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